

# **Die Rolle der humanen Serinprotease HTRA1 in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Jasmin Schillinger  
geb. Nelles

Aus Oberhausen  
Oktober 2017

## Angaben zur Prüfung

Die, der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden, Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie II der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer
3. Gutachter: Prof. Dr. Christian Behrends

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Markus Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2017

### Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

Schmidt N., Irle I., Ripkens K., Lux V., Nelles J., Johannes C., Parry L., Greenow K., Amir S., Campioni M., Baldi A., Oka C., Kawaichi M., Clarke A.R., Ehrmann M. (2016). "Epigenetic silencing of serine protease HTRA1 drives polyploidy." *BMC Cancer* 16(1):399

### Eingereichte Manuskripte:

Schillinger J., Severin K., Kaschani F., Kaiser M., Ehrmann M. (2017). "HTRA1 dependent cell cycle proteomics." *MCP*

Ehrmann M., Poepsel S., Nelles J., Severin K. "Delivery of proteins into mammalian cells." *EP* 15 162 558.9



*“Think about it, every day you, and me, and everybody that surrounds us destroys about 4-8% of our proteins. Practically everything is made of proteins, and every day we are losing 4-8% of them, which means that within a month or a month-and-a-half, every single molecule of protein that had been in your body has gone. You are a completely new person, but nevertheless you are the same.”*

*Aaron Ciechanover*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Angaben zur Prüfung</b>	<b>2</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>12</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>16</b>
1.1. Proteasen	16
1.2. Die HtrA Familie der Serinproteasen	17
1.3. Die humanen HtrA Proteasen	18
1.4. Die humane Serinprotease HTRA1	20
1.4.1. HTRA1 als Tumorsuppressor	23
1.4.2. HTRA1 und CARASIL	25
1.5. Der ERK-Signalweg	26
1.6. Der programmierte Zelltod	31
1.7. Zielsetzung	34
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>36</b>
2.1. Material	36
2.1.1. Bakterienstämme	36
2.1.2. Eukaryotische Zelllinien	36
2.1.3. Nährmedien und Zusätze	37
2.1.4. Vektoren und Plasmide	38
2.1.5. Oligonukleotide	39
2.1.6. Antikörper und Farbstoffe	40
2.1.7. Biochemikalien und Chemikalien	43
2.1.8. Komplettsysteme	45
2.1.9. Verbrauchsmaterialien	46
2.1.10. Geräte	46
2.1.11. Software	48
2.2. Molekularbiologische Methoden	49
2.2.1. Polymerasekettenreaktion	49
2.2.2. Agarosegelelektrophorese	49
2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50

---

2.2.4.	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.2.5.	Kultivierung von <i>E. coli</i>	50
2.2.6.	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	51
2.2.7.	Isolation von DNA aus <i>E. coli</i>	51
2.2.8.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	51
2.2.9.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	52
2.2.10.	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	52
2.2.11.	cDNA Synthese	52
2.2.12.	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR (qRT-PCR)	53
2.3.	Zellbiologische Methoden	56
2.3.1.	Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen	56
2.3.2.	Auftauen eukaryotischer Zellen	56
2.3.3.	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	57
2.3.4.	Bestimmung der Zellzahl und das Erstellen von Wachstumskurven	57
2.3.5.	Herstellung von Proteinlysaten	58
2.3.6.	Stimulation von SW480 Zellen mit EGF	59
2.3.7.	Induktion von Zelltod und SubG1-Messung	59
2.3.8.	Synchronisation von SW480 Zellen	60
2.3.9.	Zellzyklusmessung von SW480 Zellen mittels Durchflusszytometrie	61
2.3.10.	Transfektion von SW480 Zellen	62
2.3.11.	Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	62
2.3.12.	Aufnahme von rekombinantem HTRA1 durch SW480 Zellen	64
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	65
2.4.1.	Produktion rekombinanter Proteine und Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	65
2.4.2.	Reinigung von HTRA1 $\Delta$ mac	65
2.4.3.	Reinigung von HTRA1 $\Delta$ PDZ-eGFP	66
2.4.4.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	68
2.4.5.	SDS-PAGE	68
2.4.6.	Coomassie-Färbung	69
2.4.7.	Silberfärbung	69
2.4.8.	Western Blot-Analyse und Immundetektion	70
2.4.9.	Co-Immunpräzipitation	71
2.4.10.	<i>Pulldown</i> Experimente	72
2.4.11.	Aktivitätsbestimmung von HTRA1 durch die Hydrolyse von Proteinen	73

---

2.4.12. Aktivitätsbestimmung von HTRA1 durch die Hydrolyse eines pNA-Substrates	74
2.4.13. Analytische Größenausschlusschromatographie	75
2.4.14. <i>Crosslink</i> Methode	75
2.4.15. Massenspektrometrische Analyse des SW480-Proteoms	76
2.5. Statistische Analysen	77
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>78</b>
3.1. Der Einfluss von Htra1 auf aggressive Tumor-Mausmodelle	78
3.2. Die humane Zelllinie SW480 als experimentelles System	80
3.3. Analyse der Interaktion von HTRA1 mit dem ERK-Signalweg	82
3.3.1. Die Interaktion von HTRA1 und C-RAF in SW480 Zelllysaten	82
3.3.2. Die Interaktion von HTRA1 und C-RAF <i>in vitro</i>	86
3.3.3. Der Einfluss von HTRA1 auf die RAF Level in SW480 Zellen	90
3.3.4. Analyse der zellulären Lokalisation von HTRA1 und C-RAF	93
3.3.5. Der Einfluss von HTRA1 auf die Aktivität des ERK-Signalweges	99
3.3.6. Die Synchronisation von SW480 Zellen	102
3.3.7. Der Einfluss von rekombinantem HTRA1 auf die ERK-Signalweg Aktivität	106
3.4. Die Aufnahme von HTRA1 in SW480 Zellen	108
3.5. Eine HTRA1 abhängige Proteom-Analyse über den Zellzyklus	114
3.5.1. Eine Analyse des SW480 Proteoms über den Zellzyklus	116
3.5.2. Der Effekt eines HTRA1 Verlustes auf das Proteom einzelner Zellzyklusphasen	123
3.5.3. Die Level von 62 Proteinen korrelierten invers mit dem HTRA1 Level	124
3.5.4. Die Interaktion von HTRA1 und Annexin A1	128
3.5.5. Die Level von 46 Proteinen korrelierten direkt mit dem HTRA1 Level	129
3.5.6. Differenziell regulierte HTRA1 Interaktoren	132
3.6. Der Einfluss von HTRA1 auf den Tod von SW480 Zellen	135
3.6.1. Die Quantifizierung des Zelltodes in vier SW480 Zelllinien	135
3.6.2. Der Einfluss des ERK-Signalweges auf den Tod von SW480 Zellen	139
3.7. HTRA1 und CARASIL	141
3.7.1. Die proteolytische Aktivität CARASIL-relevanter HTRA1 Mutanten	143
3.7.2. Der oligomere Zustand CARASIL-relevanter HTRA1 Mutanten	146
<b>4. Diskussion</b>	<b>151</b>

---

4.1.	Die Interaktion von HTRA1 und dem ERK-Signalweg	151
4.1.1.	HTRA1 interagiert mit C-RAF	152
4.1.2.	Die physiologische Bedeutung des HTRA1-C-RAF-Komplexes	154
4.2.	Mögliche Funktionen von HTRA1 im Zellzyklus	155
4.3.	Mögliche Funktionen von HTRA1 im programmierten Zelltod	158
4.4.	HTRA1 als zellulärer Transporter	164
4.5.	Oligomerisierungsdefekte führen zu einem Verlust der proteolytischen Aktivität klinisch relevanter HTRA1 Mutanten	165
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>168</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>170</b>
6.1.	Abstract	172
<b>7.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>174</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>192</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>204</b>
<b>10.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>206</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>207</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Konservierte Domänen-Struktur der HtrA Familie .....	18
Abb. 1.2 Struktur von HTRA1 .....	21
Abb. 1.3 Funktionen von HTRA1 innerhalb und außerhalb der Zelle .....	23
Abb. 1.4 Der ERK-Signalweg .....	27
Abb. 1.5 Die humanen RAF Isoformen .....	30
Abb. 1.6 Signalwege der Apoptose .....	33
Tab. 2.8 Oligonukleotide für qRT-PCR .....	40
Abb. 3.1 Das Überleben von aggressiven Tumor-Mausmodellen in Abhängigkeit von Htra1 .....	79
Abb. 3.2 HTRA1 Level in unterschiedlichen SW480 Zelllinien .....	80
Abb. 3.3 Wachstumskurven von SW480 Zellen .....	82
Abb. 3.4 Co-Immunpräzipitation (IP) von HTRA1 und den Proteinen des ERK- Signalweges aus SW480 Zelllysaten .....	83
Abb. 3.5 <i>Pulldown</i> (PD) der Proteine des ERK-Signalweges mit rekombinantem HTRA1 aus SW480 Zelllysaten .....	85
Abb. 3.6 Analyse eines Komplexes aus HTRA1 $\Delta$ mac und der C-RAF-RBD .....	88
Abb. 3.7 Proteolyse der C-RAF-RBD durch rekombinantes HTRA1 .....	89
Abb. 3.8 Der Einfluss von HTRA1 auf die Level von B- und C-RAF in SW480 Zellen .....	91
Abb. 3.9 Lokalisation von $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry in SW480 Zellen .....	94
Abb. 3.10 Lokalisation von endogenem C-RAF in SW480 Zellen .....	94
Abb. 3.11 Kolokalisation von $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry und endogenem C-RAF .....	95
Abb. 3.12 Lokalisation von $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry in SW480 Zellen vor Co- Transfektion .....	97
Abb. 3.13 Lokalisation von eGFP-C-RAF in SW480 Zellen vor Co-Transfektion .....	97
Abb. 3.14 Kolokalisation von $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry und eGFP-C-RAF .....	98
Abb. 3.15 Western Blot-Analyse der ERK-Signalweg Aktivität in SW480 Zellen ....	100
Abb. 3.16 Induktion der ERK-Signalweg Aktivität durch Gabe von EGF .....	101
Abb. 3.17 Synchronisation von SW480 Zellen .....	103
Abb. 3.18 Beobachtung der Zellzyklusphase von shHTRA1 und shLV Zellen nach Synchronisation in der G2-Phase .....	105
Abb. 3.19 Induktion der ERK-Signalweg Aktivität in G1- und S-Phase des Zellzyklus .....	105
Abb. 3.20 Einfluss von rekombinantem HTRA1 $\Delta$ mac auf die ERK-Signalweg Aktivität in shHTRA1 Zellen .....	107
Abb. 3.21 Reinigung von HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP mittels Affinitätschromatographie .....	109
Abb. 3.22 SEC von HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP .....	110
Abb. 3.23 Analyse des gereinigten HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP .....	110
Abb. 3.24 Aufnahme von HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP in SW480 Zellen .....	111
Abb. 3.25 Lokalisation von HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP in SW480 Zellen .....	113
Abb. 3.26 Arbeitsablauf der Proteom-Analyse .....	115

---

Abb. 3.27 Abundanz Zellzyklus regulierender Cycline .....	116
Abb. 3.28 Analyse des SW480 Proteoms über den Zellzyklus .....	118
Abb. 3.29 Variabilität der Protein-Abundanz in Abhängigkeit von HTRA1 .....	120
Abb. 3.30 Eine globale Analyse der Protein-Abundanz über den gesamten Proteom-Datensatz .....	122
Abb. 3.31 Signifikant differentiell abundante Proteine in Abhängigkeit von HTRA1	124
Abb. 3.32 Abundanz und Stabilität von Annexin A1 in Abhängigkeit von HTRA1...	129
Abb. 3.33 Quantifizierung toter SW480 Zellen nach Behandlung mit 5-FU und Q-VD .....	137
Abb. 3.34 Quantifizierung toter SW480 Zellen nach Behandlung mit 5-FU und einem MEK Inhibitor .....	140
Abb. 3.35 Lokalisation CARASIL relevanter Mutationen im HTRA1 Protein.....	141
Abb. 3.36 Lage CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten im HTRA1 Trimer.....	142
Abb. 3.37 Proteolytische Aktivität CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten.....	144
Abb. 3.38 Proteolytische Aktivität von HTRA1(R166H) in Anwesenheit des CfD-Peptides.....	145
Abb. 3.39 Oligomerisierungszustand CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten in der analytischen SEC .....	147
Abb. 3.40 Oligomerisierungszustand CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten in der Crosslink-Analyse.....	149
Abb. 4.1 Abundanzprofil von MCM Proteinen über den Zellzyklus .....	157
Abb. 4.2 Abundanzprofil ausgewählter Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren.....	159
Abb. 4.3 Modell zur möglichen Funktion von HTRA1 in der intrinsischen Apoptose. ....	163
Abb. 8.1 Synchronisation von shLV Zellen.....	192
Abb. 8.2 Synchronisation von shHTRA1 Zellen .....	193
Abb. 8.3 Synchronisation von pLV Zellen .....	194
Abb. 8.4 Synchronisation von pHTRA1 Zellen .....	195
Abb. 8.5 Pearson-Korrelationskoeffizienten der 96 analysierten Proteom-Datensätze .....	196
Abb. 8.6 Variabilität der Protein-Abundanz in Abhängigkeit der Zellzyklusphase...	197

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Bakterienstämme .....	36
Tab. 2.2 Eukaryotische Zelllinien .....	36
Tab. 2.3 Selektionsantibiotika .....	37
Tab. 2.4 Reagenzien zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen .....	38
Tab. 2.5 Vektoren für Klonierungen .....	38
Tab. 2.6 Plasmide für Proteinexpression .....	39
Tab. 2.7 Oligonukleotide für Klonierungen .....	39
Tab. 2.9 Primärantikörper .....	40
Tab. 2.10 Sekundärantikörper .....	42
Tab. 2.11 Weitere zytohistochemische Reagenzien .....	42
Tab. 2.12 Gereinigte Proteine .....	43
Tab. 2.13 Kommerziell erworbene Proteine und Peptide .....	44
Tab. 2.14 Protein- und Nukleinsäurestandards .....	44
Tab. 2.15 Komplettsysteme .....	45
Tab. 2.16 Software .....	48
Tab. 2.17 Programm der qRT-PCR Analyse am <i>RotorGene 3000</i> (Corbett Research) .....	53
Tab. 2.18 Effizienzen und Auslesetemperaturen der verwendeten qRT-PCR Primer (Tab. 2.8) .....	55
Tab. 2.19 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von SW480 Zellen .....	64
Tab. 3.1 Liste der Top 20 in asynchronen sh <i>HTRA1</i> Zellen stärker abundanten Proteine verglichen mit der shLV Kontrolle .....	125
Tab. 3.2 Liste der Top 20 in asynchronen p <i>HTRA1</i> Zellen weniger abundanten Proteine verglichen mit der pLV Kontrolle .....	126
Tab. 3.3 Die Level von 30 Proteinen korrelierten invers mit der Abundanz von HTRA1 mit einem $\log_2(x)$ <i>fold change</i> > oder < 1 .....	127
Tab. 3.4 Liste der Top 20 in asynchronen sh <i>HTRA1</i> Zellen schwächer abundanten Proteine verglichen mit der shLV Kontrolle .....	130
Tab. 3.5 Liste der Top 20 in asynchronen p <i>HTRA1</i> Zellen stärker abundanten Proteine verglichen mit der pLV Kontrolle .....	130
Tab. 3.6 Die Level von 18 Proteinen korrelieren direkt mit der Abundanz von HTRA1 mit einem $\log_2(x)$ <i>fold change</i> > oder < 1 .....	131
Tab. 3.7 Liste potentieller, Zellzyklus assoziierter HTRA1 Substrate .....	134
Tab. 4.1 Mögliche Stöchiometrien eines HTRA1 $\Delta$ mac-RBD-Komplexes .....	152
Tab. 8.1 Top 20 Proteine, deren Abundanz sich signifikant Zellzyklus abhängig änderte .....	198



---

Tab. 8.2 Top 20 Proteine, deren Abundanz sich signifikant in Abhängigkeit des HTRA1 Levels änderte .....	199
Tab. 8.3 Top 20 Proteine, deren Abundanz sich signifikant in Abhängigkeit einer Interaktion von Zellzyklusphase und HTRA1 Level änderte.....	200
Tab. 8.4 Liste von Zellzyklus assoziierten <i>GOBP-terms</i> .....	201
Tab. 8.5 Angereicherte GOBP-terms unter Proteinen, deren Abundanz invers mit dem HTRA1 Level korrelierte .....	202
Tab. 8.6 Funktionelle Klassifikation der Arten von reguliertem Zelltod durch das NCCD .....	203

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
A	Absorption
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
A. dest.	Destilliertes Wasser ( <i>Aqua destillata</i> )
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Amyloides-Precursor-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
Async	Asynchron
ATP	Adenosindtriphosphat
$\beta$	Beta
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine serum albumin</i> )
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	Cirka
cam	Chloramphenicol
CARASIL	<i>Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy</i>
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CRD	Cystein-reiche Domäne
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
$\Delta$	Delta; Differenz
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2`-Desoxynucleotid-5`-triphosphat
DRiPs	Defekte ribosomale Produkte
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix ( <i>extracellular matrix</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ERK1/2	<i>Extracellular regulated kinase 1/2</i>
FA	Formaldehyd
FCS	Fötales Kälberserum
FDR	<i>False discovery rate</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor ( <i>guanidine nucleotide exchange factor</i> )
GTP	Guanosintriphosphat
GO-term	<i>Gene ontology term</i>
h	Stunde(n)
HFS	<i>Hypotonic fluorochrome solution</i>
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horse-radish peroxidase</i> )
HTRA	<i>High temperature requirement A</i>
IAM	Iodoacetamid
IAPs	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IGFBP	<i>Insulin growth factor binding protein</i>
IgG	Immunglobulin Klasse G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid

---

JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
k	Kilo ( $10^3$ )
kb	Kilobasen
kan	Kanamycin
l	Liter
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LFQ	<i>Label-free quantification</i>
LV	Leervektor
KO	<i>Knockout</i>
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
m	Milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen activated kinase</i>
MEK1/2	<i>Mitogen activated kinase kinase 1/2</i>
min	Minute
MNE	Mittlere normalisierte Expression
MS	Massenspektrometrie
n	Nano ( $10^{-9}$ )
NBT	Nitroblautetrazolium
Ni-TED	Nickel-Tris-Carboxymethylethylendiamin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
NZA	NZ-Amin
OD	Optische Dichte
%	Prozent
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDZ	<i>Postsynaptic density of 95 kDa, discs large, zonula occludentes-1</i>
PI	Propidiumiodide
pNA	p-Nitroanilin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR

---

RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RBD	RAS-Bindedomäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie ( <i>Size exclusion chromatography</i> )
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
SS	Signalsequenz
SOS	<i>Son of sevenless</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i>
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TCS	<i>Tuberous sclerosis 2</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
U	Unit
UHPLC	<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

# 1. Einleitung

## 1.1. Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolytisch spalten und so zu einem Abbau von Zielproteinen führen. Durch den Abbau fehlgefalteter oder nicht-funktionaler Proteine, übernehmen Proteasen eine wichtige Rolle in der Proteinqualitätskontrolle der Zelle. Die prominentesten Mechanismen für den zielgerichteten Abbau von Proteinen sind das Ubiquitin-Proteasom-System, erstmals beschrieben von Avram Hershko, Aaron Ciechanover und Irwin Rose (Hershko und Ciechanover 1986, Hershko und Ciechanover 1998), sowie die Autophagozytose bzw. Chaperon vermittelte Autophagie (Ichimura *et al.*, 2000). Vermutlich sind ungefähr 30 % aller produzierten Proteine sogenannte defekte ribosomale Produkte (DRiPs), die aufgrund einer fehlerhaften Translation oder posttranslationalen Modifikation nie ihre native Konformation erlangen (Schubert *et al.*, 2000). Eine fehlende Proteinqualitätskontrolle ist mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson aber auch mit Krebs und Autoimmunerkrankungen wie Diabetes assoziiert (Wang und Maldonado 2006, Hebert und Molinari 2007, Morimoto 2008, Kiriya und Nochi 2015, Mowers *et al.*, 2017).

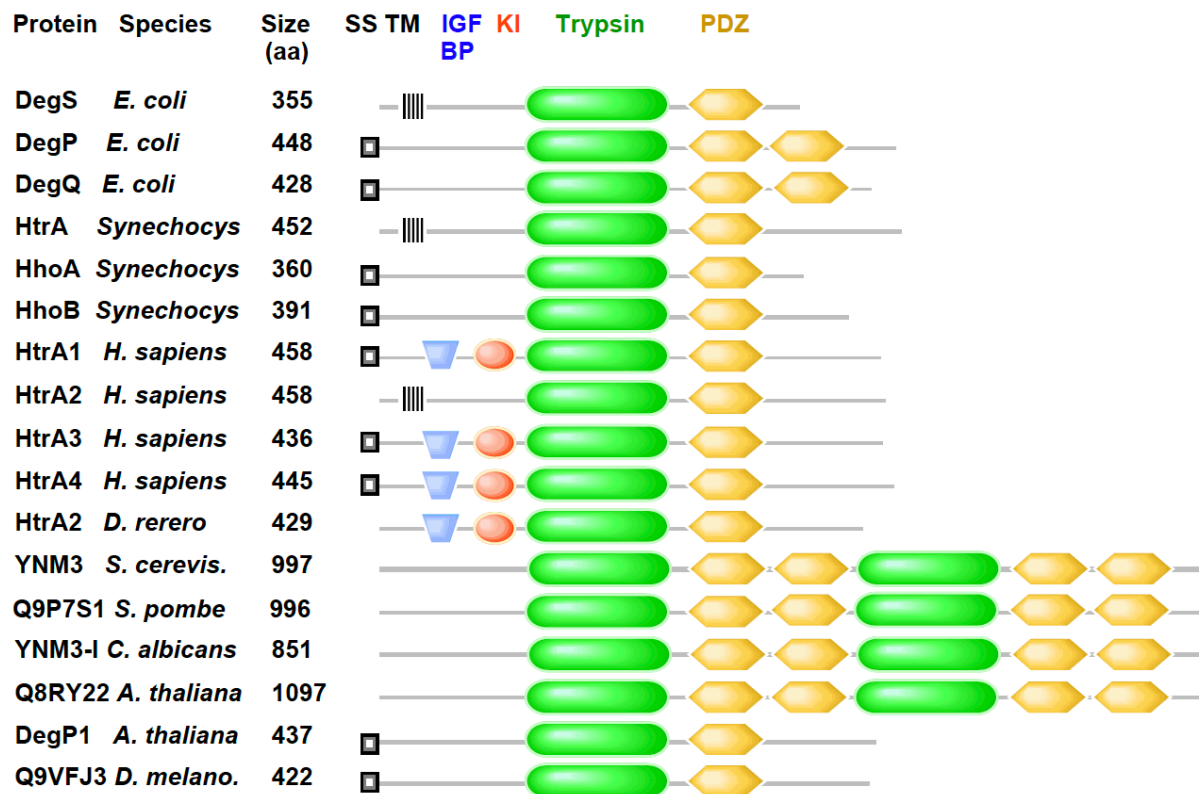
Neben der Proteinqualitätskontrolle sind Proteasen für eine Reihe regulativer Prozesse verantwortlich, die durch die Prozessierung oder den Abbau von Signalproteinen vermittelt werden. Essentielle proteolytisch-regulierte Prozesse sind die Progression des Zellzyklus durch den periodischen Abbau von Cyclinen (King *et al.*, 1996), die Induktion von Apoptose durch die Prozessierung von Caspasen (Salvesen und Dixit 1997) oder die Antigenpräsentation im Rahmen der adaptiven Immunantwort (Munz 2016).

Proteasen werden anhand der funktionellen Gruppe ihres aktiven Zentrums klassifiziert. Bisher sind sechs solcher Klassen bekannt: Serin-, Cystein-, Threonin-, Aspartat-, Glutamat- und Metallo-Proteasen. Die Bezeichnung der Klassen richtet sich nach der katalytischen Schlüsselkomponente des Enzyms (Barrett *et al.*, 2001). Des weiteren werden Proteasen anhand von Sequenzhomologien in Protease-Familien unterteilt (Barrett *et al.*, 2001).

## 1.2. Die HtrA Familie der Serinproteasen

Die HtrA (*high temperature requirement A*) Proteasen sind eine Familie hochkonservierter Serinproteasen. Sie wurden ursprünglich in *Escherichia coli* (*E. coli*) entdeckt, weil sie essentiell für das Wachstum der Bakterien bei hohen Temperaturen sind (Lipinska *et al.*, 1988, Strauch und Beckwith 1988). Weitere Studien zeigten, dass die bakteriellen HtrA Proteasen DegP und DegQ neben ihrer proteolytischen Aktivität auch eine ATP unabhängige Chaperon-Aktivität besitzen. Der Wechsel zwischen diesen beiden antagonistischen Funktionen ist temperaturabhängig (Kolmar *et al.*, 1996, Spiess *et al.*, 1999, Krojer *et al.*, 2002). Durch ihre Funktion als Proteasen und Chaperone sind die HtrA Proteasen ein wichtiger Bestandteil der bakteriellen Proteinqualitätskontrolle und Stressantwort (Clausen *et al.*, 2002). Neben den drei bakteriellen HtrA Proteasen DegP, DegQ und DegS wurden in allen Domänen des Lebens homologe HtrA Proteasen beschrieben. Darunter sind auch die vier humanen Proteasen HTRA1 – 4.

Die Mitglieder der HtrA Familie weisen eine hohe Sequenzhomologie auf (Abb. 1.1). Sie alle bestehen aus einer Trypsin-ähnlichen Proteasedomäne mit einer katalytischen Triade aus den Aminosäuren Histidin, Aspartat und Serin, sowie mindestens einer PDZ-Domäne (*postsynaptic density of 95 kDa, discs large, zonula occludentes-1*). Während die Proteasedomäne der hydrolytischen Spaltung von Proteinen dient, wurde die PDZ-Domäne als Protein-Protein-Interaktionsdomäne beschrieben (Sheng und Sala 2001). Sie bindet die drei oder vier C-terminalen Aminosäuren von Zielproteinen oder C-Terminus ähnliche Sequenzen und zeigt eine Spezifität für hydrophobe Aminosäuren (Songyang *et al.*, 1997, Harris und Lim 2001). Neben der Bindung von Substraten dient die PDZ-Domäne auch zur allosterischen Regulation und Oligomerisierung der HtrA Proteasen. Die PDZ-Domäne von DegP beispielsweise interagiert nach Bindung eines Zielproteins über den Loop L3 mit der Proteasedomäne und führt so zu einer allosterischen Aktivierung des Proteins. Dabei ist die PDZ-Domäne essentiell für die Aktivierung von DegP (Krojer *et al.*, 2008). Die Aktivierung der HtrA Proteasen ist, im Gegensatz zu klassischen Serinproteasen wie Trypsin, reversibel (Clausen *et al.*, 2002). Alle HtrA Proteasen zeigen einen oligomeren Aufbau bestehend aus trimeren Bausteinen. Bei manchen HtrA Proteasen geht eine Aktivierung mit einer allosterischen Konformationsänderung in Form eines höheren oligomeren Zustandes einher (*substrate induced oligomer conversion*)



**Abb. 1.1 Konservierte Domänen-Struktur der HtrA Familie**

Gezeigt ist die schematische Darstellung der Domänenorganisation repräsentativer HtrA Proteasen (Clausen *et al.*, 2002). Diese besitzen alle mindestens eine Trypsin-ähnliche Proteasedomäne (grün) und mindestens eine C-terminale PDZ-Domäne (gelb). Der N-Terminus der HtrA Proteasen kann verschiedene Domänen wie zum Beispiel eine Signalsequenz für die Sekretion (SS, Quadrat), eine Transmembrandomäne (TM, gestreift), eine IGF Bindedomäne (IGFBP, blau) oder Kazal-ähnliche Domäne (KI, orange) beinhalten. Die Größe der einzelnen Proteasen ist in Aminosäuren angegeben (Size(aa)).

(Krojer *et al.*, 2008, Meltzer *et al.*, 2008). Für DegP wurde beispielsweise gezeigt, dass es von einem inaktiven Hexamer zu einem aktiven 12- oder 24-mer oligomerisiert. Für die humane HtrA Protease HTRA1 konnte hingegen gezeigt werden, dass eine Aktivierung auch durch die Bindung des Substrates an das aktive Zentrum erfolgen kann (*induced fit substrate binding*) (Truebestein *et al.*, 2011).

### 1.3. Die humanen HtrA Proteasen

Von den vier humanen HtrA Proteasen (HTRA1-4) weisen HTRA1 (*PRSS11*), HTRA3 (*PRSP*) und HTRA4 (*HTRA4*) eine hohe Ähnlichkeit in der Domänenstruktur auf (Abb. 1.1). Sie alle besitzen eine Trypsin-ähnliche Proteasedomäne und eine PDZ-Domäne, sowie im N-terminalen Bereich eine Signalsequenz für die Sekretion in den extrazellulären Raum, eine IGFBP-ähnliche (*insulin growth factor binding protein*) und eine Kazal-ähnliche Domäne, die typisch für Serinprotease-Inhibitoren ist. Eine



Funktion des N-Terminus ist bis heute nicht beschrieben. Für HTRA1 konnte gezeigt werden, dass weder die IGFBP- noch die Kazal-ähnliche Domäne Einfluss auf die Aktivität der Protease haben (Eigenbrot *et al.*, 2012).

Von den vier humanen HtrA Proteasen ist HTRA1 am besten charakterisiert. Die strukturellen Merkmale und die Vielzahl beschriebener Funktionen sollen aber erst im nächsten Abschnitt näher erörtert werden (1.4). HTRA3 und HTRA4 sind bis heute wenig untersucht. Sie werden hauptsächlich mit der Bildung der humanen Plazenta und dabei mit Dysfunktionen wie Präeklampsie in Verbindung gebracht (Nie *et al.*, 2003, Inagaki *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2012). Neuere Studien deuten darauf hin, dass die Expression von HTRA4 Plazenta-spezifisch ist (Singh *et al.*, 2015). HTRA3 hingegen zeigt eine Sequenzübereinstimmung mit HTRA1 von 56 %. Die Funktionen von HTRA3 wurden teilweise als redundant mit den Funktionen von HTRA1 beschrieben. Hierunter fallen beispielweise die Inhibition des TGF $\beta$ -Signalweges oder die Proteolyse von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM). Die Expression der beiden Proteasen ist jedoch gewebespezifisch und deutet daher auf eine ergänzende Funktion beider Proteine in unterschiedlichen Geweben hin (Nie *et al.*, 2003, Tocharus *et al.*, 2004).

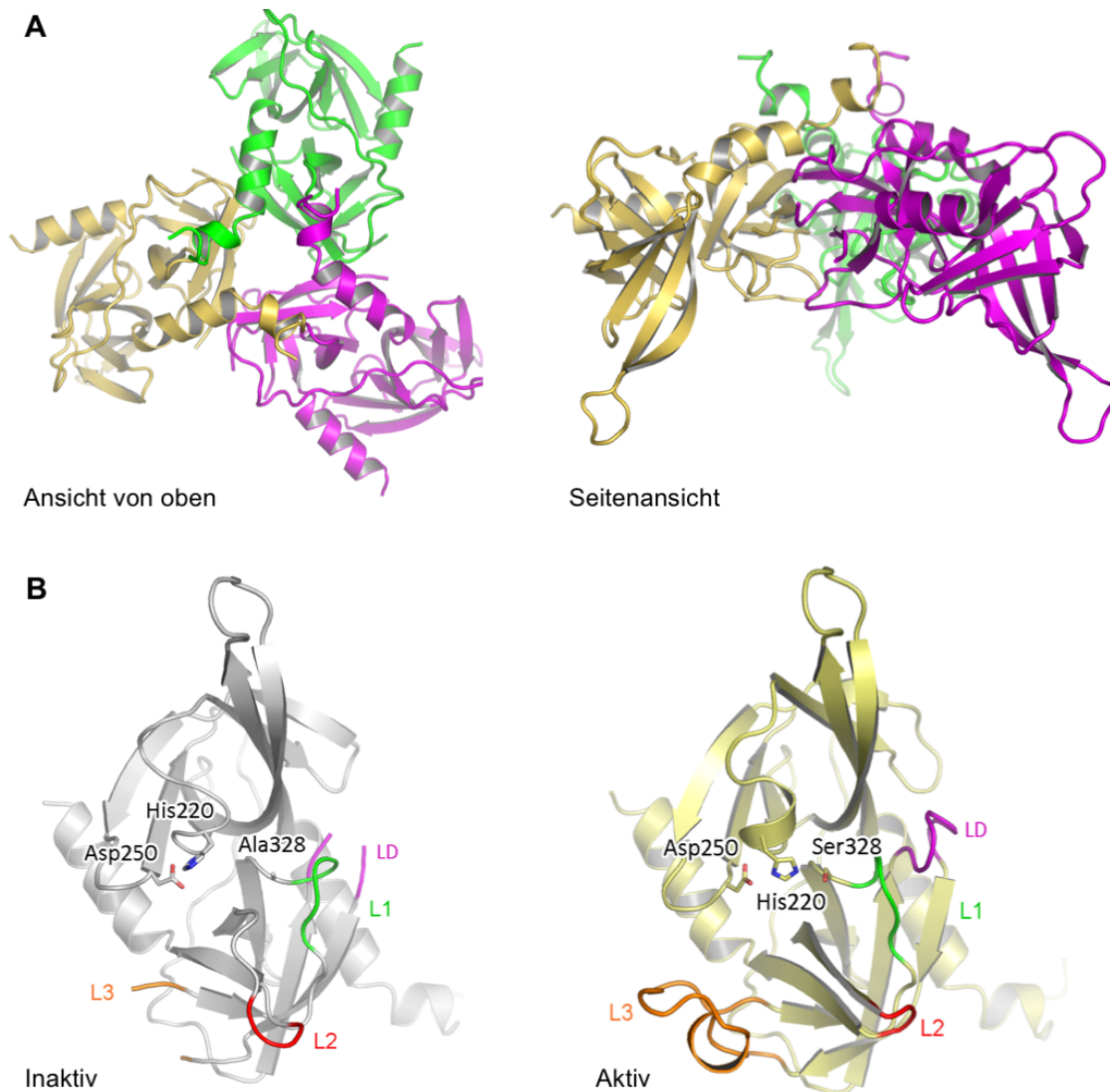
Der N-Terminus von HTRA2 (*OMI*, *PRSS25*) enthält eine Transmembrandomäne und unterscheidet sich somit stark vom N-Terminus der anderen humanen HtrA Proteasen. HTRA2 ist im Intermembranbereich der Mitochondrien lokalisiert und dort an die innere Mitochondrienmembran verankert (Vande Walle *et al.*, 2008). Ein Verlust von HTRA2 führt in Mitochondrien zur Akkumulation ungefalteter Proteine und einem Parkinson-ähnlichen Phänotyp der Zellen (Winklhofer und Haass 2010). Diese und andere Studien weisen auf eine Verbindung zwischen HTRA2 und Proteinfaltungskrankheiten wie Parkinson oder Alzheimer hin und beschreiben HAX1 (*HCLS1-associated X1 protein*) und APP ( $\beta$ -*amyloid precursor protein*) als Substrate von HTRA2 (Strauss *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2006, Huttunen *et al.*, 2007, Krick *et al.*, 2008, Moiso *et al.*, 2009). Es wird daher vermutet, dass HTRA2 eine wichtige Funktion in der Proteinqualitätskontrolle und Stressantwort humaner Zellen ähnlich der bakteriellen HtrA Proteasen besitzt (Martins *et al.*, 2004). Dazu passt die Beobachtung, dass HTRA2 unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert wird (Gray *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde für HTRA2 eine Rolle in der Regulation apoptotischer Signalwege beschrieben. Durch apoptotische Stimuli wird der N-Terminus von HTRA2

prozessiert, woraufhin HTRA2 ins Zytosol transloziert. Über den Abbau von Caspase-Inhibitoren (IAPs, *inhibitor of apoptosis proteins*) wie XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) soll HTRA2 eine pro-apoptotische Wirkung ausüben, die mit einer Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 9 einhergeht (Martins *et al.*, 2002, Verhagen *et al.*, 2002).

#### 1.4. Die humane Serinprotease HTRA1

Die humane Serinprotease HTRA1 wird durch das *PRSS11* bzw. *HTRA1* Gen kodiert, welches auf Chromosom 10 (10q25.3- q26.2) lokalisiert ist (Zumbrunn und Trueb 1997). HTRA1 ist 480 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 51 kDa. Wie bereits beschrieben (1.3) besitzt HTRA1 die typische Domänenstruktur einer HtrA Protease. Die aktive Form von HTRA1 ist das Trimer, bei dem die Proteasedomänen nach innen und die PDZ-Domänen nach außen lokalisiert sind (Abb. 1.2A) (Truebestein *et al.*, 2011, Eigenbrot *et al.*, 2012). Dabei wird die Interaktion der Monomere über die Proteasedomänen vermittelt (Trimer-Interface). Die Proteasedomäne enthält die katalytische Triade bestehend aus His220, Asp250 und Ser328, mehrere Substratbindetaschen und das Oxyanion-Loch. Die Konformation des aktiven Zentrums von HTRA1 unterscheidet sich im aktiven und inaktiven Zustand. Bei Bindung eines Substrates kommt es zu einer konformellen Änderung des aktiven Zentrums durch die Umorganisation von vier Loop-Strukturen (L1, L2, L3, LD). Die katalytische Triade wird so in eine optimale Konformation gebracht (Abb. 1.2B). Der Loop LD eines Monomers kann in aktiver Konformation mit dem Loop L3 des benachbarten Monomers interagieren und dieses aktivieren.

Die PDZ-Domäne von HTRA1 besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices, die sechs  $\beta$ -Faltblätter umgeben (Doyle *et al.*, 1996). Die Funktion der PDZ-Domäne ist für HTRA1 nicht eindeutig geklärt. Eine Aktivierung von HTRA1 durch die Bindung eines Substrates wurde, anders als bei DegP, auch in Abwesenheit der PDZ-Domäne beobachtet (Truebestein *et al.*, 2011). Andere Arbeiten weisen darauf hin, dass die PDZ-Domäne für die zelluläre Lokalisation von HTRA1 wichtig ist. Beispielsweise konnte eine Lokalisation von HTRA1 an Mikrotubuli nur in Anwesenheit der PDZ-Domäne beobachtet werden (Dissertation Anette Tennstädt, Chien *et al.*, 2009).



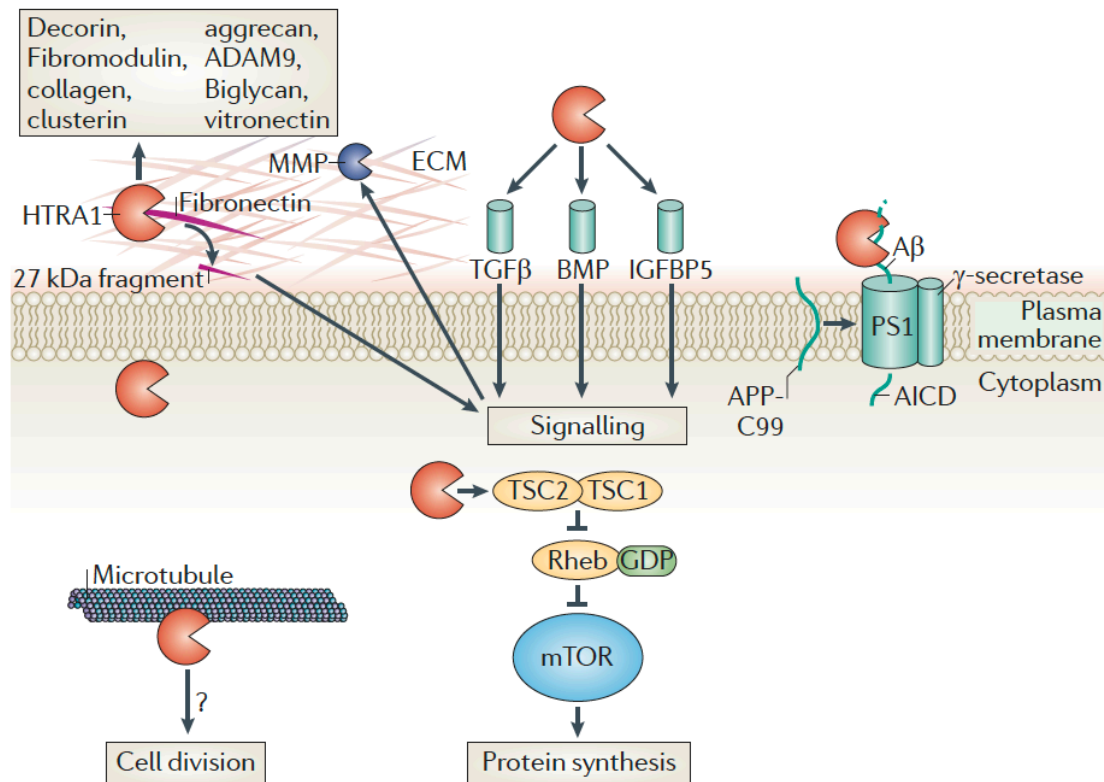
### Abb. 1.2 Struktur von HTRA1

Gezeigt ist die Kristallstruktur der Proteasedomänen der humanen Serinprotease HTRA1 (Truebestein *et al.*, 2011). Wegen ihrer hohen Flexibilität konnte die Struktur der PDZ-Domänen nicht gelöst werden. **A)** HTRA1 bildet trimere Strukturen, in denen die Proteasedomänen nach innen (Ansicht von oben) und oben (Seitenansicht) zeigen. Die einzelnen Monomere sind in verschiedenen Farben dargestellt, um deren Interaktion zu verdeutlichen. Das Trimer-*Interface* wird stets von zwei der drei Monomere gebildet. **B)** Die Konformation der Proteasedomäne von HTRA1 unterscheidet sich im aktiven und inaktiven Zustand. Bei Aktivierung kommt es zu einer konformellen Änderung des aktiven Zentrums (*disorder to order transition*), die durch Bindung eines Substrates stabilisiert wird. Die Loops des aktiven Zentrums (L1, L2, L3, LD) und die katalytische Triade (His220, Asp250, Ser328) sind markiert. Loop LD interagiert in aktiver Konformation mit dem Loop L3 des benachbarten Monomers.

Die Höhe der Expression von HTRA1 scheint stark abhängig vom beobachteten Gewebe zu sein. Eine mittlere bis hohe Expression wurde in der Plazenta, den Epithelzellen des proliferativen Endometriums, den Ovarien, den exokrinen Bereichen der Brust, sowie in der Leber, Niere und Epidermis beobachtet (De Luca *et al.*, 2003, De Luca *et al.*, 2004). Diese Beobachtung deutet auf mögliche gewebespezifische

Funktionen von HTRA1 hin. Entdeckt wurde *HTRA1* erstmals als negativ reguliertes Gen in SV40 transformierten Fibroblasten (Zumbrunn und Trueb 1996). Etwas später wurde zusätzlich eine erhöhte Expression von HTRA1 im Knorpel von Patienten mit Osteoarthritis beschrieben (Hu *et al.*, 1998). Nähere Untersuchungen zeigten, dass HTRA1 als sekretierte Protease Komponenten der ECM wie z.B. Fibronectin, Aggrecan, Decorin und Kollagen Typ II hydrolysiert und so zur Zerstörung des Gelenkknorpels beiträgt (Tsuchiya *et al.*, 2005, Grau *et al.*, 2006).

Es wird vermutet, dass sich etwa 80 % des exprimierten HTRA1 im extrazellulären Raum befindet. Extrazellulär interagiert HTRA1 nicht nur mit der ECM, sondern auch mit extrazellulären Signalproteinen wie TGF- $\beta$ , welches als weiteres HTRA1 Substrat beschrieben wurde (Abb. 1.3) (Launay *et al.*, 2008). Außerdem kolokalisiert HTRA1 mit und proteolysiert Fragmente des Amyloiden-Precursor-Proteins (APP) wie A $\beta$  (Grau *et al.*, 2005). Neben der Interaktion mit extrazellulärem A $\beta$  wurde auch eine Interaktion von HTRA1 und dem intrazellulären Tau Protein beschrieben (Tennstaedt *et al.*, 2012). HTRA1 ist nicht nur in der Lage lösliches und fibrilläres Tau zu proteolysieren, sondern zusätzlich den kompakten Kern der Tau-Fibrillen zu desintegrieren (Poepsel *et al.*, 2015). Sowohl über Tau als auch über A $\beta$  steht HTRA1 im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer. In der Zelle zeigt HTRA1, genau wie Tau, eine Lokalisation an Mikrotubuli (Dissertation Anette Tennstädt) (Chien *et al.*, 2009). Diese Lokalisation war, wie bereits erwähnt, abhängig von der PDZ-Domäne. Tubulin selbst wurde dabei als ein HTRA1 Substrat beschrieben und bringt HTRA1 mit der Zellmotilität und Zellmigration in Verbindung (Chien *et al.*, 2009). Neben den Mikrotubuli wurde eine intrazelluläre Lokalisation von HTRA1 im Zytoplasma und Zellkern beschrieben. Clawson und Kollegen identifizierten dort eine verkürzte Form von HTRA1 (29 kDa) (Clawson *et al.*, 2008). Die regulatorischen Mechanismen der HTRA1 Lokalisation und Aktivität sind bis heute nicht aufgeklärt. Ob intrazelluläres HTRA1 nach der Translation in der Zelle verbleibt oder zunächst sekretiert und anschließend reimportiert wird, ist unbekannt. Weiter ist fraglich, ob es sich bei intrazellulärem HTRA1 ausschließlich um eine verkürzte Form des Proteins handelt. Neue Ergebnisse zeigen, dass HTRA1 spontan von humanen Zellen aufgenommen werden kann (Dissertation Simon Pöpsel, Ehrmann *et al.*, *submitted*). Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch ungeklärt.



**Abb. 1.3 Funktionen von HTRA1 innerhalb und außerhalb der Zelle**

Schematisch dargestellt sind bekannte Substrate und Funktionen der humanen Protease HTRA1 (Clausen *et al.*, 2011). Extrazellulär proteolytisiert HTRA1 Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) aber auch Signalproteine wie TGF-β und IGFBP5 oder Aβ, ein Fragment des Amyloiden-Precursor-Proteins (APP). Im Cytoplasma proteolytisiert HTRA1 sowohl Tubulin als auch TSC2 und nimmt dadurch Einfluss auf den mTOR Signalweg.

HTRA1 und die anderen humanen HtrA Proteasen stehen mit vielen Erkrankungen in Zusammenhang. Neben Osteoarthritis und Morbus Alzheimer ist HTRA1 auch in die Entstehung der altersbedingten Makuladegeneration (Dewan *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2006), die Karzinogenese und die Erbkrankheit CARASIL involviert. Da die letzten beiden Implikationen für diese Arbeit von entscheidender Bedeutung sind, sollen sie in separaten Abschnitten vorgestellt werden (1.4.1, 1.4.2). Die generelle Vielzahl der Implikationen von HTRA1 in diversen Pathologien deutet auf eine essentielle Funktion dieser Protease in zellulären Prozessen hin.

#### 1.4.1. HTRA1 als Tumorsuppressor

Die humane Serinprotease HTRA1 wurde erstmals als herunter reguliertes Gen in SV40 transformierten Fibroblasten beschrieben (Zumbrunn und Trueb 1996). In weiteren Arbeiten wurde eine negative Regulation des *HTRA1* Gens auch in Tumoren der Ovarien (Shridhar *et al.*, 2002, Chien *et al.*, 2004), der Melanozyten (Baldi *et al.*,

2002), der Lunge (Esposito *et al.*, 2006), des Mesothels (Baldi *et al.*, 2008), der Leber (Zhu *et al.*, 2010) und des Endometriums (Bowden *et al.*, 2006) beobachtet. Eine Expression von HTRA1 führte in metastasierenden Melanomzellen zu einer Inhibition der Zellproliferation und -Migration (Baldi *et al.*, 2002, Chien *et al.*, 2009). Dazu passend korrelierte ein Verlust von HTRA1 in Melanomen, Endometrialkarzinomen und Lungenkarzinomen mit der Progression bzw. der Invasivität der Tumore (Baldi *et al.*, 2002, Bowden *et al.*, 2006, Esposito *et al.*, 2006, Mullany *et al.*, 2011). HTRA1 wurde deshalb als Tumorsuppressor und als Marker für eine maligne Melanom-Progression postuliert. Die verminderte Expression des *HTRA1* Gens wird vermutlich epigenetisch reguliert (Chien *et al.*, 2009, Schmidt *et al.*, 2016). In Zellen des Ovarialkarzinoms wurde allerdings auch der Verlust der Heterozygosität des *HTRA1* Gens beobachtet (Chien *et al.*, 2004).

Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der tumorsuppressiven Eigenschaften von HTRA1 sind weitestgehend ungeklärt. Der N-Terminus von HTRA1 mit einer IGFBP- und Kazal-ähnlichen Domäne hat große Ähnlichkeit zum Tumorsuppressor MAC25 (auch: IGFBP7), der das Wachstum von Osteosarkomen inhibiert und wie HTRA1 den TGF- $\beta$  Signalweg moduliert (Kato *et al.*, 1996). Der N-Terminus des HTRA1 Proteins wird deshalb auch als mac-Domäne bezeichnet. Eine Funktion der mac-Domäne wurde für HTRA1 bisher nicht identifiziert. HTRA1 ist nicht in der Lage wie MAC25 IGF zu binden (Eigenbrot *et al.*, 2012). Das Protein IGFBP5 wurde hingegen als extrazelluläres Substrat von HTRA1 beschrieben (Hou *et al.*, 2005).

Darüber hinaus führte eine negative Regulation des *HTRA1* Gens zu einer verminderten Sensitivität von Zellen des Ovarialkarzinoms (OV202) gegenüber Behandlung mit den Zytostatika Cisplatin und Paclitaxel (Chien *et al.*, 2006). Gleichzeitig korreliert das HTRA1 Level direkt mit dem Ansprechen von Patienten mit ovarialen oder gastrischen Karzinomen auf eine Chemotherapie. Ein weiteres intrazelluläres Substrat von HTRA1 ist TSC2 (*tuberous sclerosis 2*) (Abb. 1.3). Die Proteolyse von TSC2 führt zu einer Aktivierung des mTOR-Signalweges und so zu einer erhöhten Translation von Zielgenen und Proliferation der Zellen (Campioni *et al.*, 2010). Dem widersprechend zeigen HTRA1 exprimierende Zellen unter oxidativem Stress ein erhöhtes Zellüberleben aber auch eine erhöhte Induktion des p38-Signalweges, der die zelluläre Seneszenz fördert (Supanji *et al.*, 2013).

### 1.4.2. HTRA1 und CARASIL

Die Erbkrankheit CARASIL (Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) ist die einzige beschriebene monogenetische Erkrankung des humanen *HTRA1* Gens. Sie wird durch Mutationen verursacht, die zum Funktionsverlust der HTRA1 Protease führen (Hara *et al.*, 2009, Haffner *et al.*, 2016). Wie der Name impliziert, wird die Erkrankung autosomal rezessiv vererbt und ist sehr selten. Weltweit sind unter 100 Fälle bekannt, von denen die meisten in Asien beschrieben wurden (Fukutake 2011, Menezes Cordeiro *et al.*, 2015). CARASIL manifestiert sich in frühem Alter und geht mit Schlaganfällen, Persönlichkeitsveränderungen, progressiver Demenz, Alopezie und einer schmerzhaften Veränderung der unteren Wirbelsäule (Spondylose) einher. Genauere neurologische Untersuchungen von Patienten ergaben eine Demyelinisierung von Neuronen und arteriosklerotische Veränderungen von kleinen Arterien der Weißen Substanz und der Basalganglien im Gehirn (Maeda *et al.*, 1976, Yokoi und Nakayama 1985, Yanagawa *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass die fehlende HTRA1 Aktivität und somit die fehlende Regulation von TGF- $\beta$ , welches eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt, die beobachteten Symptome verursachen (Beaufort *et al.*, 2014). Diese These wird jedoch kontrovers diskutiert (Liu *et al.*, 2015). Eine Therapie für CARASIL ist bis heute nicht verfügbar.

In CARASIL Patienten wurden Mutationen des *HTRA1* Gens identifiziert (Hara *et al.*, 2009). Einige Mutationen wie A252T oder V297M liegen innerhalb der Proteasedomäne von HTRA1 und sind laut einer Computer-basierte Strukturanalyse gemeinsam mit den Aminosäuren P285 und A321 vermutlich an der korrekten Faltung des aktiven Zentrums beteiligt<sup>1</sup> (Truebestein *et al.*, 2011, Eigenbrot *et al.*, 2012). Andere bekannte Mutationen wie R370X führen zur Transkription einer instabilen mRNA (Hara *et al.*, 2009). Dennoch sind auch Mutationen beschrieben worden, bei denen der Mechanismus, der zum Verlust der proteolytischen Aktivität von HTRA1 führt, unbekannt ist. Beispiele hierfür sind die Mutationen R166H, A173T, R274Q und G295R.

---

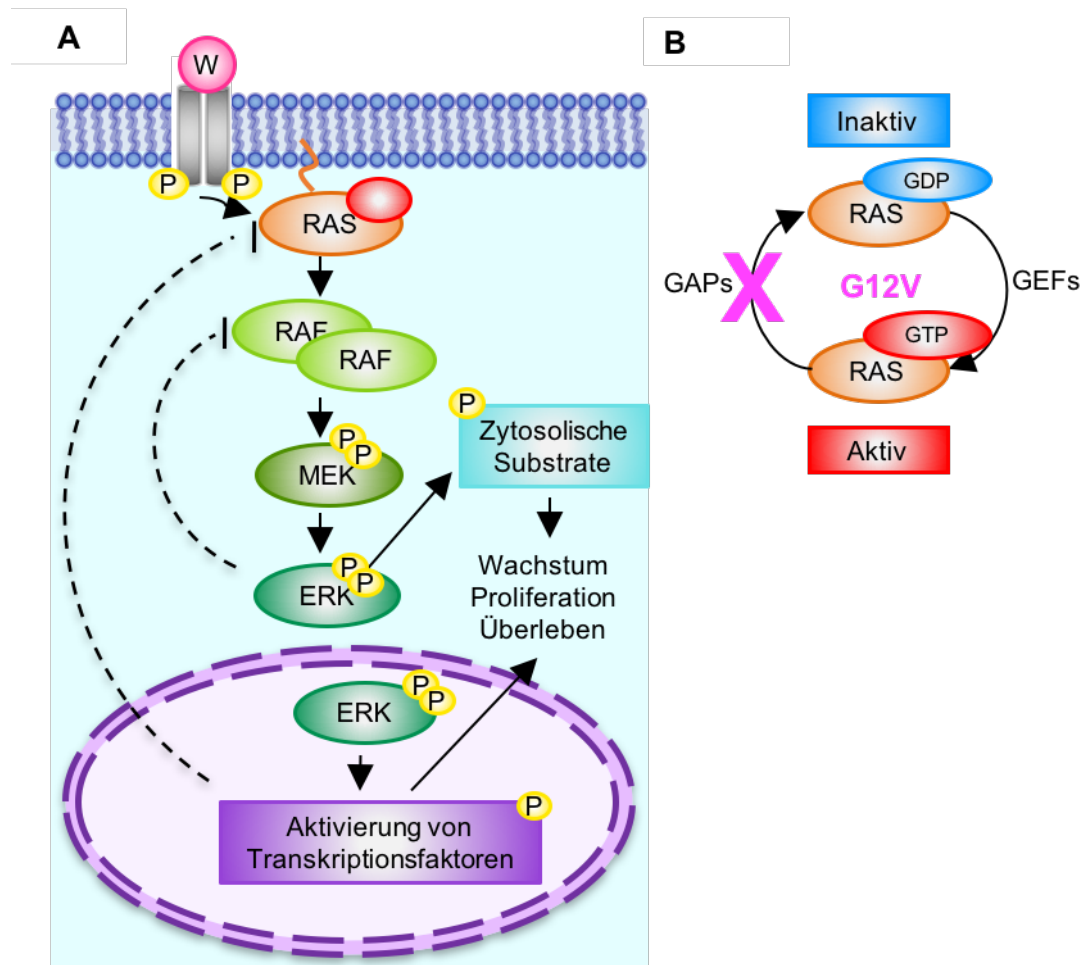
<sup>1</sup> Die Computer-basierte Strukturanalyse der HTRA1 Mutanten wurde von Dr. Kenny Bravo Rodriguez (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland) durchgeführt.

## 1.5. Der ERK-Signalweg

Die Signalwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) sind hochkonservierte Mechanismen der Signaltransduktion. Sie transduzieren einen extrazellulären Stimulus ausgehend von Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder ähnlichen Signalmolekülen in eine intrazelluläre Antwort. MAPK-Signalwege beinhalten die sequentielle Phosphorylierung von mindestens drei Serin-Threonin-Kinasen: einer MAP3K (MAP-Kinase-Kinase-Kinase), einer MAP2K (MAP-Kinase-Kinase) und einer MAPK, die in dieser Reihenfolge aktiviert werden (Raman *et al.*, 2007). Bisher sind in humanen Zellen vier MAPK-Signalwege näher untersucht worden, die jeweils nach der Effektor-MAPK benannt wurden. Der ERK1/2-Signalweg (*extracellular signal-regulated kinase*), der hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren und andere Mitogene aktiviert wird, der JNK-Signalweg (*c-Jun NH2-terminal kinase*) und der p38MAPK-Signalweg, deren Stimulation hauptsächlich durch verschiedene Formen von Zellstress ausgelöst wird, sowie der ERK5-Signalweg, der sowohl durch Mitogene als auch durch Zellstress aktiviert werden kann (Boulton *et al.*, 1991, Derijard *et al.*, 1994, Freshney *et al.*, 1994, Kyriakis *et al.*, 1994, Rouse *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 1995). Während der ERK1/2-Signalweg zu Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben führt, vermitteln der JNK- und p38MAPK-Signalweg hauptsächlich Stressantworten und Apoptose. Je nach Zelllinie und Wachstumsbedingungen wurden für die einzelnen Signalwege jedoch auch gegensätzliche Funktionen beschrieben (Bacus *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit war der ERK1/2-Signalweg von entscheidender Bedeutung. Im Folgenden wird auf diesen als ERK-Signalweg Bezug genommen.

Der klassische ERK-Signalweg (Abb. 1.4A) wird durch extrazelluläre Stimuli wie die Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*), und HGF (*hepatocyte growth factor*), sowie durch weitere Wachstumsfaktoren, Hormone und zellulären Stress aktiviert. Diese extrazellulären Stimuli werden hauptsächlich über Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) aber auch über G-Protein gekoppelte und andere Rezeptoren vermittelt (Naor *et al.*, 2000, Vigil *et al.*, 2010). Bei Bindung eines Liganden an eine RTK kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und folgend zu mehreren Autophosphorylierungen von intrazellulären Tyrosinen. An die phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors können dann Adapterproteine wie GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) binden, die eine SH2-Domäne besitzen.





**Abb. 1.4 Der ERK-Signalweg**

**A)** Schematische Darstellung des ERK-Signalweges (Modifiziert nach (Kim und Bar-Sagi 2004)). Bindet ein Wachstumsfaktor (W, pink) an eine RTK (grau), dimerisiert die RTK, wird autophosphoryliert und rekrutiert über Adapterproteine membranboundenes RAS (orange). RAS wird aktiviert und rekrutiert RAF an die Plasmamembran. RAF wird in einem komplexen Mechanismus, der die Bildung von Homo- oder Hetero-Dimeren und mehrere Phosphorylierungen beinhaltet, aktiviert. Aktives RAF phosphoryliert MEK dual, welches wiederum ERK dual phosphoryliert. Aktives ERK phosphoryliert entweder zytosolische Substrate oder migriert in den Zellkern (lila), wo es Transkriptionsfaktoren aktiviert. Insgesamt fördert eine Aktivierung des ERK-Signalweges das Wachstum, die Proliferation und das Überleben der Zelle. Negative Feedback Mechanismen sind als gestrichelte Linien dargestellt (Brummer *et al.*, 2003, Dougherty *et al.*, 2005). **B)** Die GTPase RAS kann zwischen einem inaktiven und aktiven Zustand wechseln. Im inaktiven Zustand ist GDP (blau) an RAS gebunden. Mit der Hilfe von GEFs wird GDP freigesetzt. Daraufhin kann GTP (rot) gebunden werden, wodurch es zu einer aktivierenden konformellen Änderung von RAS kommt. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP wird RAS erneut inaktiviert. GAPs beschleunigen die Hydrolyse von GTP. Die kanzerogene Mutation G12V führt zu einer Insensitivität gegenüber GAPs und einem Verlust der GTPase Aktivität von RAS, wodurch RAS dauerhaft im aktiven Zustand verbleibt.

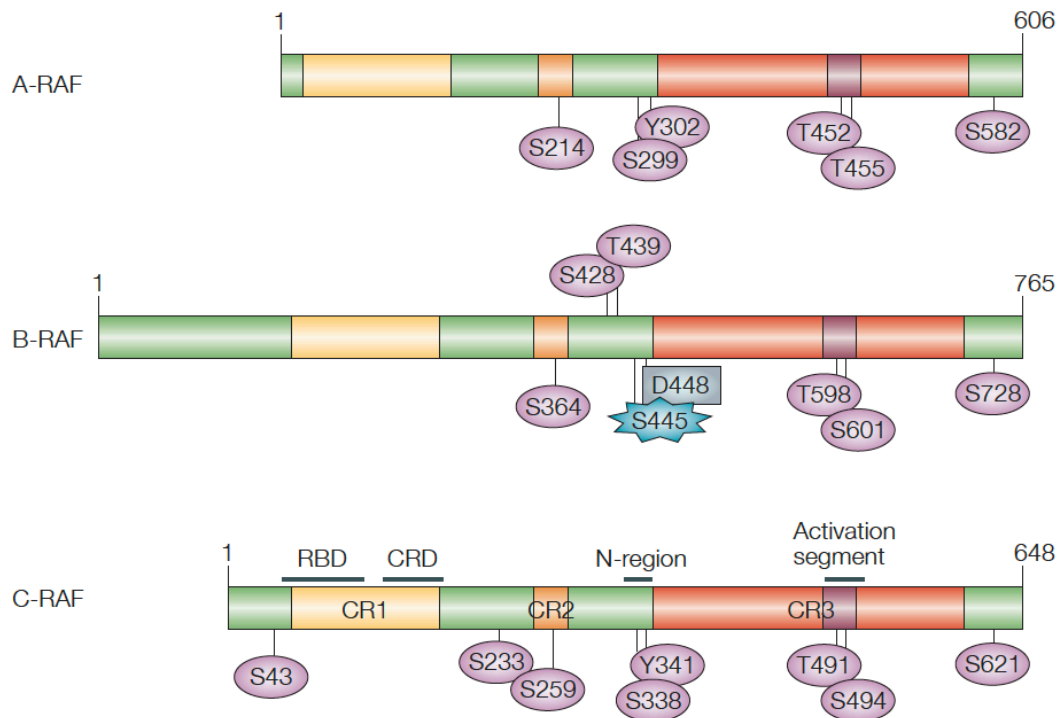
Die Adaptoren interagieren über eine SH3 Domäne mit anderen Proteinen wie dem Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanidine nucleotide exchange factor*, GEF) SOS (*son of sevenless*). SOS wird bei Rezeptoraktivierung an die Plasmamembran rekrutiert und kann dort über eine RAS-Bindedomäne (RBD) von

membranassoziiertem RAS (*rat sarcoma*) gebunden werden (Margarit *et al.*, 2003). Ras Proteine gehören zur Superfamilie der kleinen GTP bindenden Proteine, die erstmals als ein virales Gen mit onkogenem Effekt beschrieben wurden (Scolnick *et al.*, 1970). Diese monomeren Proteine mit einer molekularen Masse zwischen 20 - 40 kDa können sowohl Guanosintriphosphat (GTP) als auch Guanosindiphosphat (GDP) binden. Sie besitzen eine GTPase Aktivität und übernehmen eine wichtige Rolle in vielen Signalwegen. Sie werden nach der Ähnlichkeit ihrer Effektordomänen in fünf Proteinfamilien eingeteilt: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran (Johnson und Dhanasekaran 1989).

Zur Unterfamilie der Ras Proteine gehören unter anderem die vier p21-RAS Isoformen H-RAS, N-RAS, K-RAS 4A und K-RAS 4B. Letztere entstehen durch alternatives *Splicing* des *K-RAS* Gens (Chang *et al.*, 1982, McGrath *et al.*, 1983). KRAS 4B wird dabei häufiger exprimiert als KRAS 4A. Die Gene *H-RAS*, *N-RAS* und *K-RAS* werden fast ubiquitär exprimiert. Jedoch scheint es in unterschiedlichen Geweben und zu unterschiedlichen Entwicklungsstufen alternierende Expressionslevel zu geben. In Mäusen beispielsweise wird das *K-ras* Gen am häufigsten in Darm, Lunge und Thymus exprimiert, seltener jedoch in der Haut und Skelettmuskelzellen. Die Expression des *H-ras* Gens ist in Gehirn, Muskeln und Haut am höchsten und in der Leber am geringsten. Das *N-ras* Gen hingegen wird vermehrt in Testis und Thymus exprimiert (Furth *et al.*, 1987, Leon *et al.*, 1987). Weil sich die vier RAS Isoformen nicht nur in ihrer Expression in verschiedenen Geweben, sondern auch in ihrer Prozessierung unterscheiden, sie in Säugern aber hochkonserviert sind und mutierte Isoformen spezifisch in verschiedenen Tumoren vorkommen, werden ihnen unterschiedliche funktionelle Spezifitäten zugesprochen (Castellano und Santos 2011). Sie zeigen eine Sequenzhomologie von bis zu 90 % und unterscheiden sich hauptsächlich in ihren C-Termini (Linardou *et al.*, 2011). Der C-Terminus bestimmt dabei, ob das Protein Plasmamembran- oder Endomembran-assoziiert ist oder zytosolisch vorliegt und ist essentiell für eine korrekte Funktion (Willumsen *et al.*, 1984). Die Interaktion der Ras Proteine und ihrer Effektoren wird vermutlich über die zelluläre Lokalisation der Proteine reguliert. Beispielsweise kann Plasmamembran-gebundenes K-RAS zur Transformation von Zellen führen, während mitochondriales K-RAS Apoptose induziert (Chiu *et al.*, 2002, Bivona *et al.*, 2006).

Die Aktivierung von RAS ist reversibel (Abb. 1.4B). RAS wechselt dabei zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen, und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand. GEFs wie SOS initiieren dabei den Austausch von RAS gebundenem GDP zu GTP. Eine damit einhergehende konformelle Änderung von RAS führt zur Aktivierung des Proteins. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) hingegen stimulieren die GTPase Aktivität von RAS, indem sie den langsamen Vorgang der GTP Hydrolyse katalysieren (Boguski und McCormick 1993, Hall *et al.*, 2002, Buday und Downward 2008). Aktivierende Mutationen wie die Aminosäuresubstitution G12V im K-RAS Protein führen zu einem GAP-insensitiven RAS mit verminderter GTPase Funktion und so zu einem konstitutiv aktiven Protein. In ca. 16 % aller humanen Tumore führte eine Mutation in einem der drei RAS Gene zu einer Substitution der Aminosäuren G12, G13 oder Q61 (Riely *et al.*, 2008, Forbes *et al.*, 2011).

Aktives RAS bindet an viele *downstream* Faktoren, von denen RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) am besten charakterisiert ist. Raf Proteine sind Serin-/Threonin-Kinasen, die ähnlich wie die Ras Proteine häufig in humanen Tumoren mutiert vorliegen. Sie stellen die MAP3K des ERK-Signalweges dar. Es sind drei humane RAF Isoformen bekannt: A-RAF, B-RAF und C-RAF. Alle drei Isoformen besitzen je drei konservierte Regionen (CR1-3) (Abb. 1.5) (Chong *et al.*, 2003, Wellbrock *et al.*, 2004). Die CR1 beinhaltet die RBD und Cystein-reiche Domäne (CRD), die für eine Rekrutierung von RAF an die Plasmamembran und die Aktivierung durch RAS benötigt werden (Marais *et al.*, 1995). Der N-Terminus von RAF spielt eine entscheidende Rolle für die RAF Lokalisation in der Zelle (Marais *et al.*, 1997). Die CR2 ist eine Serin/Threonin-reiche Domäne und enthält eine Bindestelle für 14-3-3 Proteine. Diese sogenannten Gerüstproteine bringen die beteiligten Kinasen des Signalweges in räumliche Nähe bzw. fördern die Bildung von Proteinkomplexen und vermitteln so deren Interaktion (Morrison und Davis 2003). Eine negativ geladene, regulatorische Domäne befindet sich direkt vor der CR3. Die CR3 enthält die Kinasedomäne und somit die katalytische Untereinheit von RAF. Alle Isoformen besitzen mehrere bekannte aktivierende oder inhibierende Phosphorylierungsstellen (Abb. 1.4A) (Chong *et al.*, 2003, Wellbrock *et al.*, 2004). Um RAF vollständig zu aktivieren ist sowohl die Phosphorylierung aktivierender und die Dephosphorylierung inhibierender Stellen, als auch eine Homo- oder Heterodimerisierung von RAF nötig (Marais *et al.*, 1995, Roskoski 2010, Matallanas *et al.*, 2011). Bekannt ist außerdem, dass sowohl die differentielle Expression bzw. Lokalisation von RAF und RAS in der



**Abb. 1.5 Die humanen RAF Isoformen**

Gezeigt ist die schematische Darstellung der drei humanen RAF Isoformen A-RAF, B-RAF und C-RAF (Wellbrock *et al.*, 2004). Alle Isoformen besitzen je drei konservierte Regionen (CR1-3). CR1 (gelb) beinhaltet die RAS-Bindedomäne (RBD) und Cystein-reiche Domäne (CRD), die für die Rekrutierung von RAF an die Plasmamembran benötigt werden. CR2 ist eine Serin/Threonin-reiche Domäne und enthält eine Bindestelle für 14-3-3-Proteine (S259 in C-RAF). Die anderen Bindestellen für 14-3-3-Proteine sind S233 und S621. Die regulatorische N-Domäne (*N-region*) befindet sich direkt vor der CR3 (C-RAF: Y341, B-RAF: D448, A-RAF: Y302). Die CR3 enthält die Kinasedomäne von RAF. Die Nummern der Aminosäuren in der nativen Proteinsequenz sind angegeben. Bekannte Phosphorylierungsstellen sind markiert. Inhibierende Phosphorylierungen sind: S43 und S259 in C-RAF und S364, S428 und T439 in B-RAF. Alle anderen markierten Stellen sind aktivierende Phosphorylierungen.

Zelle, sowie eine unterschiedliche Affinität der einzelnen RAS- und RAF-Isoformen zueinander eine spezifische Regulation von MAPK-Signalwegen ermöglichen (Weber *et al.*, 2000, Harding *et al.*, 2003).

Aktiviertes RAF phosphoryliert im Rahmen des ERK-Signalweges anschließend die MAP2Ks MEK1 (*MAP2K1*) und MEK2 (*MAP2K2*) (Gomez und Cohen 1991, Crews *et al.*, 1992). Zur Aktivierung werden MEK1 und MEK2 durch RAF an je zwei Serinresten (S218 und S222 für humanes MEK1) phosphoryliert (Alessi *et al.*, 1994). MEK1 und MEK2 sind sogenannte dual-spezifische Kinasen. Sie weisen eine hohe Selektivität für die MAPKs ERK1 (*MAPK3*) und ERK2 (*MAPK1*), auf (Segar *et al.*, 1992). Lange Zeit wurde vermutet, dass ERK1 und ERK2 die einzigen Substrate von MEK1 und MEK2 sind. Neue Studien deuten jedoch darauf hin, dass MEK1 und MEK2

auch weitere Substrate phosphorylieren (Tang *et al.*, 2015). Um ERK1 und ERK2 zu aktivieren, ist die Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes notwendig (T183 und Y185 für humanes ERK2). ERK1 und ERK2 wiederum sind ubiquitär exprimierte Serin-/Threonin-Kinasen, die eine Vielzahl von Substraten phosphorylieren. Diese Substrate können sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisiert sein (Abb. 1.5). Aktiviertes ERK ist in der Lage, in den Nukleus zu translozieren und dort Transkriptionsfaktoren zu aktivieren (Yoon und Seger 2006). Je nach Art des Stimulus fällt die resultierende zelluläre Antwort unterschiedlich aus. Neben der Lokalisation und Affinität der beteiligten Proteine, können auch Gerüstproteine die Dauer der Interaktion bzw. des Signals beeinflussen. Darüber hinaus wurden für den ERK-Signalweg interne Feedback-Mechanismen beschrieben, die die Aktivität des Signalweges regulieren (Abb. 1.4A). Beispielsweise reguliert ERK2 durch eine duale Phosphorylierung des B-RAF C-Terminus negativ die B-RAF Aktivität (Brummer *et al.*, 2003). Auch eine negative Regulation von C-RAF durch MEK und ERK wurde beschrieben (Dougherty *et al.*, 2005).

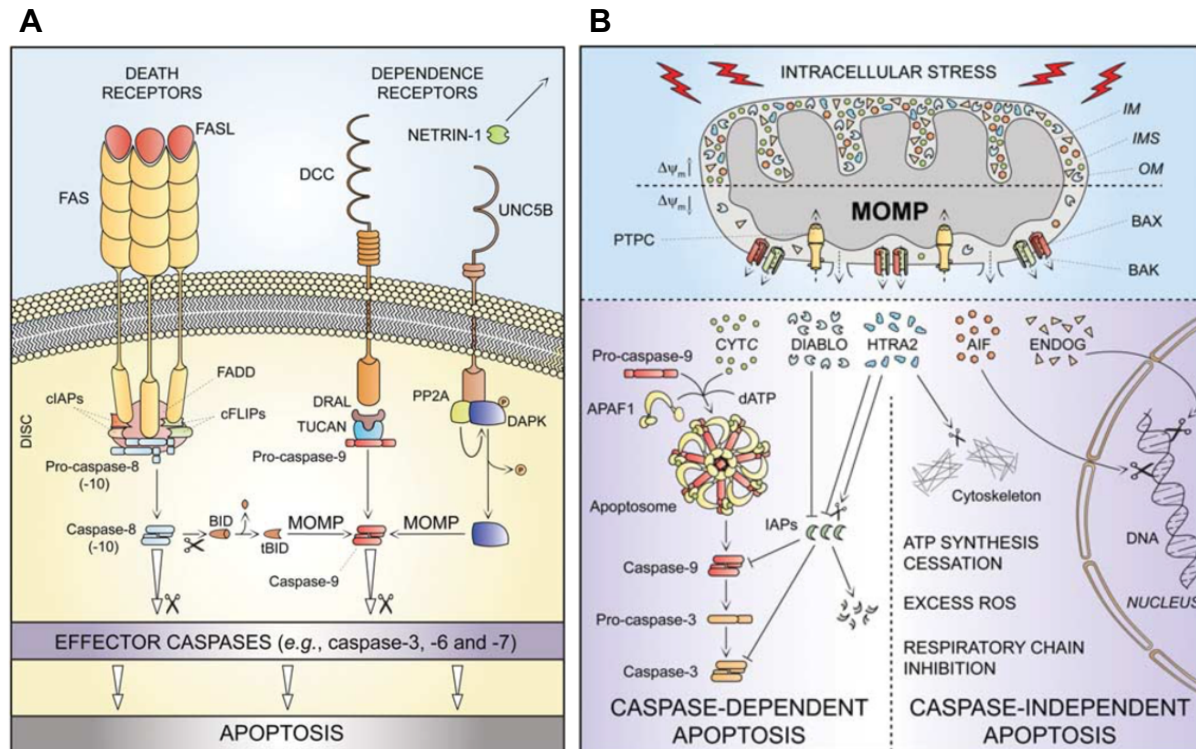
Letzendlich führt eine Aktivierung des ERK-Signalweges zu Zellproliferation, -Wachstum, -Überleben und -Differenzierung. Er spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse, sondern auch in der Entstehung vielfältiger Tumorerkrankungen. Deshalb sind sowohl die Ras als auch Raf Proteine Ziele medikamentöser Therapien (Downward 2003).

## 1.6. Der programmierte Zelltod

Der programmierte Zelltod ist der streng kontrollierte Tod einer einzelnen Zelle. Er wird über intrinsische oder extrinsische Signale vermittelt. Eine Balance von Proliferation und Zelltod ist für die Integrität von Geweben in einem mehrzelligen Organismus unerlässlich. Eine Deregulierung kann zu Erkrankungen wie Krebs, Autoimmun- oder neurodegenerativen Erkrankungen führen (Hengartner 2000, Fadeel und Orrenius 2005, Fischer und Schulze-Osthoff 2005, Favaloro *et al.*, 2012). Ursprünglich wurden, basierend auf den morphologischen Veränderungen sterbender Zellen, drei Arten von Zelltod unterschieden: Apoptose, Autophagie und Nekrose. Mittlerweile werden stattdessen auf biochemischer Ebene 13 verschiedene Arten von Zelltod differenziert (Galluzzi *et al.*, 2012). Eine Übersicht der, durch das *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD), definierten Arten von reguliertem Zelltod ist in Tab. 8.6 dargestellt. Im Rahmen dieser Dissertation soll das Augenmerk auf die Apoptose gelegt werden.

Die Apoptose zeichnet sich morphologisch durch einen Abbau des Zytoskeletts bzw. das Schrumpfen der Zelle, die Fragmentierung von DNA und die Bildung von apoptotischen Körperchen und Vesikeln aus (Taylor *et al.*, 2008). Die Phagozytose apoptotischer Zellen oder Zellbestandteile verhindert eine Entzündungsreaktion. Apoptose wird in die extrinsische und intrinsische Apoptose unterschieden. Extrinsische Signale werden über Liganden vermittelt, die an spezifische Transmembranrezeptoren, die sogenannten *death receptors* wie den FAS/CD95 oder TRAIL-Rezeptor binden (Wajant 2002). Eine zweite Form von Rezeptoren, die extrinsische Apoptose vermitteln, sind die sogenannten *dependence receptors* wie UNC5A-D. Diese leiten nur dann ein apoptotisches Signal weiter, wenn die Konzentration ihrer Liganden unter eine kritische Grenze sinkt (Mehlen und Bredesen 2011). Je nach Rezeptor und Zelltyp werden dann verschiedene Adapterproteine rekrutiert, die letztendlich über die regulatorischen Caspasen 8 oder 9 die Effektorcaspasen 3, 6 oder 7 aktivieren (Abb. 1.6A).

Die intrinsische Apoptose hingegen wird durch vielerlei Arten von zellulärem Stress wie DNA Schädigungen und oxidativem Stress ausgelöst. Allen gemein ist die Beteiligung mitochondrialer Proteine (Kroemer *et al.*, 2007). Pro-apoptotische Signale führen zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) z.B. durch Proteine der Bcl-2 Familie wie BAX und BAK. Folgend wird die ATP Synthese unterbrochen und reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt. Zusätzlich werden Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranbereich wie Cytochrom C oder HTRA2 in das Zytosol entlassen, wo sie beispielsweise durch den Abbau von IAPs die Caspase-Kaskade über Caspase-9 und -3 aktivieren. Darüber hinaus wurden auch Caspase unabhängige Signalwege beschrieben, die zu Apoptose führen. So resultiert die Freisetzung von AIF und ENDOG beispielsweise in einer Fragmentierung der DNA, während HTRA2 weitere zelluläre Substrate wie Proteine des Zytoskeletts proteolysiert.



**Abb. 1.6 Signalwege der Apoptose**

Dargestellt sind repräsentative Signalwege der extrinsischen (A) oder intrinsischen (B) Apoptose (Galluzzi *et al.*, 2012). **A**) Durch die Bindung von Liganden an *death receptors* oder die fehlende Bindung von Liganden an *dependence receptors* werden extrinsische Signale über verschiedene Adapterproteine in eine Aktivierung der Caspase-Kaskade umgewandelt. Bei manchen Signalwegen kommt es dabei zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP), manchmal über die Aktivierung des *BH3-only* Proteins BID zu tBID (truncated BID). **B**) Zellulärer Stress wie DNA Schädigungen und oxidativer Stress führen über verschiedene Signalwege zur Induktion der intrinsischen Apoptose. Pro-apoptische Signale führen beispielsweise durch Proteine der Bcl-2 Familie wie BAX und BAK zu MOMP, was zu einer Unterbrechung der ATP Synthese und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führt. Außerdem werden Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranbereich in das Zytosol entlassen, wo sie über eine Aktivierung der Caspase-Kaskade (Caspase-9 und -3) oder Caspase unabhängig Apoptose induzieren.

Eine entscheidende Rolle in vielen apoptotischen Signalwegen spielt die Familie der Caspasen. Diese Cysteinproteasen liegen als inaktives Pro-Enzym vor und werden durch das Entfernen der sogenannten Prodomäne zur aktiven Caspase prozessiert (Los *et al.*, 1999, Fuentes-Prior und Salvesen 2004). Nach ihrer Struktur und Funktion in apoptotischen Signalwegen unterscheidet man Caspasen in Initiator- und Effektor-Caspasen. Die Initiator-Caspasen -8, -9 und -10 aktivieren die Effektor-Caspasen -3, -6, und -7. Während die Initiator-Caspasen als Monomer aktiv sind, bilden die Effektor-Caspasen Homodimere aus (Fuentes-Prior und Salvesen 2004). Aktive Effektor-Caspasen proteolysieren wiederum Substrate, die verschiedenste Funktionen innerhalb der Zelle ausüben (Fischer *et al.*, 2003, Julien und Wells 2017).

HTRA1 wurde bisher mehrfach mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht. Die Expression von aktivem *HTRA1* in OV202 Zellen führte zu einer erhöhten Apoptose-Rate und einer erhöhten Aktivität der Caspasen 3 und 7. Die vermehrte Apoptose und Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wird vermutlich über den Caspase-Inhibitor XIAP vermittelt, der ein weiteres HTRA1 Substrat darstellt (He *et al.*, 2012). In Zellen des retinalen Pigmentepithels führte ein *Knockout* von *HTRA1* nach Bestrahlung zu einer Inhibition apoptotischer Prozesse durch die verminderte Expression der pro-apoptotischen Proteine Bax und Caspase-3, sowie durch eine erhöhte Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 (Yu *et al.*, 2017).

## 1.7. Zielsetzung

Die beschriebene Vielzahl von Implikationen der humanen Serinprotease HTRA1 in pathologische Prozesse deutet auf wichtige zelluläre Funktionen der Protease hin. Eine Analyse der biochemischen und physiologischen Funktionen von HTRA1 sind deshalb von allgemeinem Interesse. Vor Beginn dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der *Cardiff School of Biosciences* eine *in vivo* Studie bezüglich des Einflusses von Htra1 auf die Entstehung von Kolonkarzinomen durchgeführt<sup>2</sup>. In zwei von vier untersuchten aggressiven Tumor-Mausmodellen zeigte Htra1 einen protektiven Effekt auf das Überleben der Mäuse. Ziel dieser Arbeit ist es, den zugrundeliegenden Mechanismus näher zu analysieren. Ein protektiver Effekt von Htra1 war *in vivo* nur zu beobachten, wenn *K-ras* mutiert vorlag. Darüber hinaus wurde vor Beginn dieser Arbeit in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin ein Peptidscreen durchgeführt<sup>3</sup>. In diesem, für die PDZ-Domäne optimierten, Screen wurden die C-Termini von 6223 Proteinen auf eine Bindung an HTRA1 getestet (Boisguerin *et al.*, 2004, Boisguerin *et al.*, 2007). Dabei waren B-RAF und C-RAF unter den ersten 500 potentiellen HTRA1 Liganden. Das Augenmerk wird in dieser Dissertation deshalb auf eine mögliche Interaktion zwischen HTRA1 und dem ERK-Signalweg gelegt. Um die Interaktion von HTRA1 mit den Proteinen des ERK-Signalweges zu untersuchen, muss in einem ersten Schritt ein geeignetes experimentelles System gefunden und charakterisiert werden. Im

---

<sup>2</sup> Die Experimente wurde von Kirsty Greenow, Alan R. Clarke und Kollegen (Cardiff University, Cardiff, UK) durchgeführt

<sup>3</sup> Der Peptidscreen wurde von Prisca Boisguerin und Rudolf Volkmer (Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland) durchgeführt.



Anschluss daran sollen in diversen biochemischen und Zellkultur-basierten Analysen die Protein-Protein-Interaktionen, die Aktivität des Signalweges und die Lokalisation einiger Proteine innerhalb humaner Zellen analysiert werden. Ein Nachweis der Interaktion von HTRA1 mit dem ERK-Signalweg könnte neue Aufschlüsse über die Funktion von HTRA1 in der Regulation zellulärer Signalwege, sowie in Zellproliferation und Zellüberleben liefern. In einem weiteren Schritt soll deshalb auch der Effekt von HTRA1 auf die Proliferation und das Überleben humaner Zellen untersucht werden. Um die Rolle von HTRA1 in einen größeren Kontext einordnen zu können, soll abschließend der Einfluss von HTRA1 auf das humane Proteom mit besonderem Augenmerk auf Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose untersucht werden. Hierzu muss zunächst die Synchronisation der verwendeten Zellen in distinkten Zellzyklusphasen etabliert werden.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit soll der Fokus auf die einzige monogenetische Erkrankung von *HTRA1* gelegt werden. Dazu soll der Effekt von vier CARASIL relevanten HTRA1 Mutationen aus dem Trimer-*Interface* von HTRA1 näher untersucht und mit der Mutante A252T verglichen werden. Da die Mutationen das Trimer-*Interface* betreffen, soll sowohl die Aktivität als auch der oligomere Zustand der Mutanten analysiert werden. Eine Charakterisierung von klinisch relevanten HTRA1 Mutanten kann das Verständnis dieser Erkrankung verbessern und daher möglicherweise als Basis zur Entwicklung einer Protein-basierten Therapie dienen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Bakterienstämme

Die verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21 (DE3)	$F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB^+]_{K-12}(\lambda^S)$	(Studier und Moffatt 1986)
BL21 (DE3) Rosetta 2 <sup>TM</sup>	$F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB^+]_{K-12}(\lambda^S) pRARE2 (Cam^R)$	(Studier und Moffatt 1986)
DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	$F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 \phi80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), \lambda^-$	(Hanahan 1983)

#### 2.1.2. Eukaryotische Zelllinien

Bei den verwendeten eukaryotischen Zelllinien handelte es sich ausschließlich um Zellen aus *Homo sapiens*. Eine Auflistung findet sich in Tab. 2.2.

Tab. 2.2 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Spezifikation	Herkunft
SW480	Kolorektales Adenokarzinom	DSMZ
SW480 shHTRA1	Viral transduziert mit einem lentiviralen Expressionsvektor (pLKO), der für eine shRNA gegen <i>HTRA1</i> codiert	Nina Schmidt
SW480 shLV	Viral transduziert mit einem leeren lentiviralen Expressionsvektor (pLKO)	Nina Schmidt
SW480 pHTRA1	Viral transduziert mit einem retroviralen Expressionsvektor (p50), der für <i>HTRA1</i> codiert	Nina Schmidt
SW480 pLV	Viral transduziert mit einem leeren retroviralen Expressionsvektor (p50)	Nina Schmidt
HeLa	Zervixkarzinom	ATCC/LGC

### 2.1.3. Nährmedien und Zusätze

Die verwendeten Bakterienstämme (2.1.1) wurden auf NZ-Amine (NZA) Festmedium (NZA-Agar) oder in flüssigem NZA Medium kultiviert. Im Falle einer Selektion wurde dem Medium das entsprechende Selektionsantibiotikum (Tab. 2.3) zugesetzt.

NZA Medium	
NZA Amine	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

NZA Medium	
NZA Medium	
Bacto-Agar	15 g
<i>A. dest</i>	ad 1000 ml

Verwendete eukaryotische Zelllinien (2.1.2) wurden entweder in *Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium* (RPMI) (SW480 Zellen) oder *Dublecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert (HeLa Zellen). Unter normalen Wachstumsbedingungen wurden dem Medium 10 % fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 Units/ml PenicillinG, 10000 µg/ml Streptomycinsulfat) zugesetzt. Die Medien und Zusätze wurden von der Firma Invitrogen/Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) bezogen. Die verwendeten Selektionsantibiotika sind in Tab. 2.3 aufgelistet. Darüber hinaus wurden bei der Arbeit mit eukaryotischen Zellen oder deren Lysaten weitere Reagenzien verwendet. Diese sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

**Tab. 2.3 Selektionsantibiotika**

Antibiotikum	Finale Konzentration [µg/ml Medium]	Herkunft
Ampicillin	200	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloramphenicol	30	Carl Roth (Karlsruhe)
Kanamycinsulfat	100	Carl Roth (Karlsruhe)
Geneticin (G418)	1000	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Puromycin	1,6	Sigma-Aldrich (München)

**Tab. 2.4 Reagenzien zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen**

Reagenz	Herkunft
5-Fluoruracil	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Cdk1 Inhibitor RO-3306	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
EGF (human)	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
MEK Inhibitor VII	Merck (Darmstadt)
Nocodazol	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	Invitrogen/Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Q-VD-OPh Hydrat	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Thymidin	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Trypsin-EDTA	Invitrogen/Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

#### 2.1.4. Vektoren und Plasmide

Für Klonierungen (2.2.4) wurden die Vektoren aus Tab. 2.5 verwendet.

**Tab. 2.5 Vektoren für Klonierungen**

Vektor	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3.1	Eukaryotischer Expressionsvektor, CMV-Promoter	Thermo Fisher (Darmstadt)
pcDNA3-CRAF-fl	pcDNA3.1-Vektor mit der cDNA von humanem C-RAF	Carolin Koerner (MPI Dortmund)
pEGFP-N1	Eukaryotischer Expressionsvektor mit dem Fluorophor eGFP, CMV-Promoter	Clontech (Heidelberg)
pET21d	Bakterieller Expressionsvektor, T7-Promoter	Merck (Darmstadt)
pET-Protease_HtrA1_SA	Bakterieller Expressionsvektor mit der inaktiven Proteasedomäne (S328A) von humanem HTRA1, T7-Promoter	Linda Trübestein

Plasmide, die für die Proteinexpression in Bakterien oder eukaryotischen Zellen verwendet wurden, sind in Tab. 2.6 zusammengestellt.

**Tab. 2.6 Plasmide für Proteinexpression**

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3-eGFP-CRAF_fl	pcDNA3.1 mit humanem C-RAF fusioniert an eGFP (N-terminal)	Diese Arbeit
pcDNA3.1_GFP	pcDNA3.1-Vektor mit der cDNA von GFP	Diese Arbeitsgruppe
pmCherry-N1-deltassHtrA1SA	pmCherry-N1 mit der inaktiven Variante von HTRA1 (S328A) ohne Signalsequenz	Anette Tennstädt
pmCherry-N1	Eukaryotischer Expressionsvektor mit dem Fluorophor mCherry	Clontech (Heidelberg)
pET21d_HTRA1protSA-eGFP	pET21d mit der inaktiven Proteasedomäne (S328A) von humanem HTRA1 fusioniert an eGFP (C-terminal), C-terminaler His-Tag	Diese Arbeit
pN-StrepII_HTRA1dmac	pN-StrepII mit der verkürzten aktiven Version von humanem HTRA1 (Aminosäuren 158 – 480), N-terminaler StrepII-Tag	Melisa Merdanovic

### 2.1.5. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden ausschließlich von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen und sind in Tab. 2.7 und Tab. 2.8 aufgeführt.

**Tab. 2.7 Oligonukleotide für Klonierungen**

Name	Interne Nummer	Nukleotidsequenz (5' - 3')
eGFP fw KpnI	1068	ATATGGTACCATGGTGAGCAAGG
eGFP rev Linker BamHI	1069	ATATGGATCCCCTTCCCTTGTACAGCTCGTCCATG
H1prot fw NcoI	455	ATATCCATGGATGGGGCAGGAAG
H1prot rev EcoRI	456	ATATGAATTCTTTTCCTTTGGCCT
GFP fw EcoRI Link	451	ATATGAATTCGGTTCAGGTTCAATGGTGAGCAA
GFP rev XhoI	452	ATATCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCAT

Tab. 2.8 Oligonukleotide für qRT-PCR

Name	Interne Nummer	Nukleotidsequenz (5' - 3')
hHtrA1 fw	437	GCAACTCAGACATGGACTACATC
hHtrA1 rev	438	GTGTTAATTCCAATCACTTCACCG
hB-RAF fw	493	ATCTGGAGGCCTATGAAGAATAC
hB-RAF rev	494	TAACGGTATCCATTGATGCAGAG
hC-RAF fw	495	CCAGATCCTGTCTTCCATTGA
hC-RAF rev	496	GCATTGATATCCTCAGTGTGG
GAPDH for	633	GCTTGTCATCAATGGAAATCCC
GAPDH rev	634	AGCCTTCTCCATGGTGG
RibProtL13a for	635	GGTGGTCGTACGCTGTG
RibProtL13a rev	637	GGTCCGCCAGAAGATGC

### 2.1.6. Antikörper und Farbstoffe

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tab. 2.9, die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tab. 2.10 dargestellt. Reagenzien, die verwendet wurden um zelluläre Bestandteile zu visualisieren, sind in Tab. 2.11 aufgelistet.

Tab. 2.9 Primärantikörper

Zielstruktur	Wirt	Verdünnung	Blockier- lösung	Herkunft
		Western Blot FACS (IF)		
Aktin	Maus, monoclonal	1:10.000	Magermilch	MP Biomedicals (Eschwege)
$\alpha$ -Tubulin	Maus, monoclonal	(1:500)	BSA	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Annexin A1	Kaninchen, monoclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
BrdU (FITC konjugiert)	Maus, monoclonal, IgG <sub>1</sub>	1:5	BSA	BD Biomedicals (Heidelberg)
ERK1/2	Kaninchen, polyclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
ERK1/2	Maus, monoclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)

HTRA1 (Kazal-ähnliche Domäne)	Kaninchen, polyclonal	1:1000	Magermilch	Diese Arbeitsgruppe
HTRA1 (PDZ-Domäne)	Kaninchen, polyclonal	1:1000	Magermilch	Triple Point Biologics (Forest Grove, OR, USA)
Isotypkontrolle IgG XP®	Kaninchen, monoclonal	-	-	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
Isotypkontrolle IgG <sub>1</sub>	Maus, monoclonal	-	-	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
Isotypkontrolle IgG <sub>1</sub> (FITC konjugiert)	Maus, monoclonal	1:5	BSA	BD Biomedicals (Heidelberg)
K-RAS	Maus, monoclonal	1:250	BSA	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
MEK1/2	Kaninchen, polyclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
MEK1/2	Maus, monoclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
N-RAS	Maus, monoclonal	1:500	BSA	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
pan-RAS	Maus, monoclonal	1:500	BSA	Merck (Darmstadt)
Phospho B-RAF	Kaninchen, polyclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
Phospho C-RAF	Kaninchen, polyclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
Phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen, polyclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
Phospho MEK1/2 (Ser217/221)	Kaninchen, polyclonal	1:1000	BSA	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
RAF-1	Kaninchen, polyclonal	1:750 (1:100)	Magermilch	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
RAF-B	Maus, monoclonal	1:500	BSA	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
Strep-Tag	Maus, monoclonal	1:2000	Magermilch	QIAGEN (Hilden)

**Tab. 2.10 Sekundärantikörper**

<b>Zielstruktur</b>	<b>Wirt</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Herkunft</b>
Kaninchen IgG	Ziege, polyclonal	AP	DaKoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Kaninchen IgG	Esel, polyclonal	HRP	Amersham / GE Healthcare (München)
Kaninchen IgG	Esel, polyclonal	Alexa-488	Invitrogen / Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Kaninchen IgG Konformationsspezifisch	Maus, monoclonal	HRP	Cell signaling (Leiden, Niederlande)
Maus IgG	Ziege, polyclonal	AP	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Maus IgG	Schaf, whole	HRP	Amersham / GE Healthcare (München)
Maus IgG	Ziege, polyclonal	Alexa-633	Invitrogen / Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

**Tab. 2.11 Weitere zytohistochemische Reagenzien**

<b>Reagenz</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
DAPI	Bindet A-T-reiche Regionen der DNA	Invitrogen / Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Propidiumiodid	DNA-interkalierend	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Bromdesoxyuridin	Thymidin-Analogon	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
HDGreen <sup>TM</sup>	Bindet DNA und RNA	INTAS (Göttingen)



### 2.1.7. Biochemikalien und Chemikalien

#### *Proteine und Enzyme*

Die gereinigten Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 2.12 aufgelistet. Darüber hinaus wurden Proteine und Peptide auch kommerziell erworben (Tab. 2.13).

**Tab. 2.12 Gereinigte Proteine**

<b>Protein</b>	<b>Wirtszelllinie</b>	<b>Herkunft</b>
C-RAF-RBD	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Juliana Rey
HTRA1(A252T)	<i>Homo sapiens</i> HEK293T	Dr. Nathalie Beaufort (Institute for Stroke and Dementia Research, München)
HTRA1(G295R)	<i>Homo sapiens</i> HEK293T	Dr. Nathalie Beaufort (Institute for Stroke and Dementia Research, München)
HTRA1(R166H)	<i>Homo sapiens</i> HEK293T	Dr. Nathalie Beaufort (Institute for Stroke and Dementia Research, München)
HTRA1(R274Q)	<i>Homo sapiens</i> HEK293T	Dr. Nathalie Beaufort (Institute for Stroke and Dementia Research, München)
HTRA1(S328A)	<i>Homo sapiens</i> HEK293T	Dr. Nathalie Beaufort (Institute for Stroke and Dementia Research, München)
HTRA1(WT)	<i>Homo sapiens</i> HEK293T	Dr. Nathalie Beaufort (Institute for Stroke and Dementia Research, München)
HTRA1 $\Delta$ mac	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta 2	Diese Arbeit, Daten nicht gezeigt
HTRA1 $\Delta$ mac(S328A)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta 2	Juliana Rey
HTRA1 $\Delta$ PDZ	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta 2	Dr. Melisa Merdanovic
HTRA1 $\Delta$ PDZ(S328A)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta 2	Juliana Rey
HTRA1 $\Delta$ PDZ(S328A)-eGFP	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta 2	Diese Arbeit

**Tab. 2.13 Kommerziell erworbene Proteine und Peptide**

<b>Protein / Peptid</b>	<b>Herkunft</b>
Annexin A1	Cellsciences (Newburyort, MA, USA)
β-Casein	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
DNase I	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
EGF (human)	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Lys-C	Wako Chemicals (Neuss)
Magermilchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Phusion High Fidelity Polymerase	NEB (Ipswich, MA, USA)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Ipswich, MA, USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
RNase	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Thrombin	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
Trypsin	Promega (Mannheim)
Trypsin-EDTA	Invitrogen/Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
VFNTLPMMGKASPV-pNA	AG Kaiser, Universität Duisburg-Essen

### *Protein- und Nukleinsäurestandards*

Verwendete Standards für Proteine und Nukleinsäuren sind in Tab. 2.14 aufgeführt.

**Tab. 2.14 Protein- und Nukleinsäurestandards**

<b>Protein / Peptid</b>	<b>Herkunft</b>
FPLC Gelfiltration LMW&HMW Standard	Bio-Rad (München)
HiMark Prestained HMW Standard	Invitrogen/Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Quick-Lead 2-Log DNA Ladder	NEB (Ipswich, MA, USA)
SDS-PAGE Standard Prestained	Bio-Rad (München)
SDS-PAGE Standard Unstained	Bio-Rad (München)

### *Sonstige Chemikalien*

In dieser Arbeit für Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „pro analysis“ und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA), Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Soweit nicht anders vermerkt, wurde hochreines Milli-Q-Wasser (vollentsalztes Wasser mit nachgeschaltetem *water purification system* EPA Est. 41237-MA-1, Merck, Darmstadt) verwendet, welches im Rahmen dieser Arbeit als *A. dest.* bezeichnet wird.

### **2.1.8. Komplettsysteme**

Verwendete Komplettsysteme sind in Tab. 2.15 aufgelistet.

**Tab. 2.15 Komplettsysteme**

<b>Komplettsystem</b>	<b>Hersteller</b>
ABolute QPCR Mix SYBR Green	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
ECL Chemolumineszenz-Kit (West Pico und Femto)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
NucleoBond® Xtra Maxi	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel Extraction	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® PCR Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® RNA Clean-up	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
Rapid DNA Ligation	Roche, Mannheim
Roti®-Nanoquant	Carl Roth (Karlsruhe)
Verso cDNA Synthesis	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

### 2.1.9. Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Falcon Röhrchen 12 x 75 mm mit Zellsieb	BD Biosciences, Heidelberg
GE Hiload 26/60 Superdex 200 (325 ml)	GE Healthcare, München
GE Superdex 200 10/300 GL (24 ml)	GE Healthcare, München
GE Superdex 200 3.2/300 GL (2,4 ml)	GE Healthcare, München
Kryo-Lagerungsflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Millipore Duapore PVDF Membran Filter	Merck, Darmstadt
NuPage Novex Midi Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Protino NiTED-Material	Macherey-Nagel, Düren
PVDF Blotting Membran	Amersham/GE Healthcare, München
Reaktionsgefäße (0,5 oder 1,5 ml Volumen)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (2 ml Volumen)	Eppendorf, Hamburg
Schraubröhren (15 oder 50 ml Volumen)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5, 10 und 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm)	PALL, East Hills, USA
Strep Tactin Superflow	Iba Lifesciences, Göttingen
Strep-Tactin Magnetic <i>Beads</i>	Qiagen, Hilden
Vivaspin 20 oder 0,5 ml MWCO 10 kDa	Sartorius, Göttingen
Zellkultur Schalen und Multiwell-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsiebe (Porengröße 70 µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellulosemembran Whatman	GE Healthcare, München

### 2.1.10. Geräte

Analysewaage	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
Analysewaage	Mettler-Toledo, Gießen
Autoklav	BeliMed, Mühldorf am Inn
Bioruptor Sonication System	Diagenode, Liege, BE
CO <sub>2</sub> -Inkubator HEPA Class 100	Thermo Fisher, Darmstadt
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Countess II FL Automated Cell Counter	Thermo Fisher, Darmstadt
DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen	Peqlab, Erlangen
EASY-nLC 1000 LC System	Thermo Fisher, Darmstadt
Entwicklungsmaschine CAWOMAT 2000	Cawo, Schrobenehausen
FPLC-ÄKTA	GE Healthcare, München

---

FPLC-ÄKTAmicro	GE Healthcare, München
French Press SLM Aminco	Thermo Fisher, Darmstadt
Geldokumentation	Intas, Göttingen
Gelelektrophorese-Apparaturen	Bio-Rad, München
Heizblock 1201/1202	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Horizontalschüttler VXR Vibrax	IKA, Staufen
HPLC 1260	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC Säule Bio SEC-5 300	Agilent Technologies, Waldbronn
Inkubationsschüttler Innova 44	New Brunswick, New Jersey, USA
Inkubationsschüttler Multitron Standard	Infors, Einsbach
Kippschüttler	Hecht-Assistent, Sondheim/Rhön
Konfokales Mikroskop (TCS-SP5)	Leica Microsystems, Wetzlar
MACSQuant VYB Durchflussszytometer	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Magnetrührer RCT Standard	IKA, Staufen
Magnetrührer RSM 01HS	Phoenix Instrument, Effretikon, CH
Massenspektrometer Orbitrap Elite 1000	Thermo Fisher, Darmstadt
PCR Thermocycler T Personal	Biometra, Göttingen
pH-Meter SevenCompact	Mettler-Toledo, Gießen
qRT-PCR Gerät Rotor-Gene 3000	Corbett Research (jetzt QIAGEN)
Rollenmischgerät	Hecht-Assistent, Sondheim/Rhön
Rührschüttler Rotator SB3	Stuart, Staffordshire, UK
Scanner	Canon, Krefeld
Sicherheitswerkbank HERA Safe HS12	Heraeus, Hanau
Spannungsgerät PowerPac 200	Bio-Rad, München
Spannungsgerät PowerPac HC	Bio-Rad, München
Spektrophotometer Genios Pro	Tecan, Crailsheim
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher, Darmstadt
Spektrophotometer SmartSpec Plus	Bio-Rad, München
Spektrophotometer SpectraMax M5	Molecular Devices, Biberach a.d. Riss
Standzentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter, Krefeld
ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5424R 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Sprout	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Typhoon FLA 9500	GE Healthcare, München
Vakuumpumpe Typ N811KN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Vortex Minishaker MS2	IKA, Staufen
Waage Serie 165 BJ	Precisa, Dietikon, CH
Western Blot Apparatur	Bio-Rad, München
Western Blot Apparatur Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
XCell4 SureLock Midi-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.11. Software

Die verwendete Software ist in Tab. 2.16 aufgeführt.

**Tab. 2.16 Software**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
CodonCode Aligner Demo	CodonCode Corporation, Centerville, USA
Endnote™ X8	Clarivate Analytics, Stamford, USA
Fiji	Open Source (Schindelin <i>et al.</i> , 2012)
FlowJo™ Version 10.2	FlowJo, LLC, Ashland, USA
GOrilla online tool	Open Source (Eden <i>et al.</i> , 2009)
GraphPad Prism Version 6	GraphPad Software Inc., LaJolla, USA
Leica Application Suite Advanced Fluorescence	Leica Microsystems, Wetzlar
MACSquantify	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MaxQuant	Open Source (Cox <i>et al.</i> , 2011)
Microsoft® Office für Mac 2010/2017	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Perseus computational platform	Open Source (Tyanova <i>et al.</i> , 2016)
Photoshop® Elements 10	Adobe Systems Inc., San Francisco, USA
Q-Gene 1.2	Simon P. (Simon 2003)
RotorGene Software	Corbett Research (jetzt QIAGEN)
Serial Cloner Version 2.6.1	Open Source (Serial Basics)

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Bakterienstämmen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Vorschriften des Gentechnikgesetzes für das Arbeiten mit GVOs (S1) wurden bei allen Arbeitsgängen eingehalten. Der mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung im Autoklaven (BeliMed) hitzesterilisiert (20 min, 120 °C, 2-3 bar). Auch die verwendeten Lösungen und Medien, sowie Glasgeräte (4 h, 210 °C) wurden hitzesterilisiert. Temperaturinstabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Poren 0,2 µm).

### 2.2.1. Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA im Rahmen der Klonierung von Plasmiden wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Die PCR wurde mit der Phusion High Fidelity Polymerase (NEB) entsprechend der Herstellerangaben im *Thermocycler T Personal* (Biometra) durchgeführt. Das Programm wurde an die Schmelztemperaturen der verwendeten Oligomere und die Länge des PCR Produktes angepasst. Die Größe der PCR Produkte wurde im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2) kontrolliert, bevor die Produkte mit dem *NucleoSpin® PCR Clean-up* Komplettsystem (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt wurden.

### 2.2.2. Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA wurden Gele mit 0,8 - 1,5 % (w/v) Agarose verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde die Agaroselösung mit 5 µl HDGreen/100 ml Volumen versetzt (Tab. 2.11) und anschließend zu einem Flachbettgel gegossen. Die DNA wurden mit 1/6 Volumen eines 6x DNA-Probenpuffers versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und anschließend bei einer konstanten Spannung von 120 V in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der DNA erfolgte durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) und gleichzeitiger Aufnahme einer SW-Kamera in der Geldokumentations-Station (Intas).

TAE-Puffer (50x)	
Tris pH 8	2,42 g
Acetat	57,1 g
EDTA 0,5 M pH 8	100 ml
A. dest	ad 1000 ml

DNA-Probenpuffer (6x)	
Glycerol	30 ml
EDTA 0,5 M pH 8	30 ml
Bromphenolblau	30 mg
A. dest	ad 100 ml

### 2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrophotometer *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher) gemessen. Als Referenz diente der jeweilige Puffer der Nukleinsäure oder *A. dest.*. Als Maß der Reinheit von DNA oder RNA wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm berechnet. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Die Probe galt als rein, wenn der berechnete Quotient bei 1,8 (DNA) bzw. bei 2,0 (RNA) lag.

### 2.2.4. Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Die gereinigten PCR Produkte (2.2.1) wurden zunächst durch Restriktionsenzyme (NEB) geschnitten. Dazu wurden sowohl das PCR Produkt als auch der Zielvektor mit den passenden Endonukleasen inkubiert. Inkubationszeit, -Temperatur und -Puffer wurden nach Herstellerangaben ausgewählt. Die geschnittenen Produkte wurden anschließend vollständig mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2) aufgetrennt und aus dem Agarosegel aufgereinigt. Hierzu wurde das *NucleoSpin® Gel Extraction* Komplettsystem (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Ligation von PCR-Produkt und Zielvektor wurde das *Rapid DNA Ligation* Komplettsystem (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben eingesetzt.

### 2.2.5. Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* Bakterien wurden auf Festmedium (NZA-Agar) oder in NZA Flüssigmedium kultiviert. Die Temperatur zur Anzucht der Bakterien betrug je nach Versuch 18 °C – 37 °C. Die Inokulation von Flüssigkulturen mit einzelnen *E. coli* Kolonien einer Stammpatte erfolgte mit Hilfe einer Impföse. Zur Isolation kleinerer Mengen DNA wurden Kulturvolumina bis 5 ml NZA-Medium beimpft, für größere Mengen Volumina bis zu 200 ml. Für die Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* (2.4.1) wurden die Flüssigkulturen direkt mit den Transformationsansätzen (2.2.4) beimpft, um die Expressionseffizienz zu steigern. Alle Kulturen wurden in einem Inkubationsschüttler (Inforce) bei 180 rpm inkubiert. Nach einer Inkubation von mindestens 12 h wurden die Kulturen als Übernachtskultur (ÜN-Kultur) bezeichnet.



### 2.2.6. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte von *E. coli* Bakterien in Flüssigkulturen wurde durch das Messen der optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) an dem UV/VIS-Spektrophotometer *SmartSpec Plus* (BioRad) bestimmt. Unter diesen Bedingungen entsprach eine  $OD_{600}$  von 1 einer Zellzahl von ungefähr  $10^9$  Zellen pro ml Kultur (Miller 1972).

### 2.2.7. Isolation von DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch Verwendung der jeweiligen Komplettsysteme der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben. Für die Isolation kleiner Mengen wurde das *NucleoSpin® Plasmid*, bei größeren Mengen das *NucleoBond® Xtra Maxi* Komplettsystem verwendet. Für die Isolation von Plasmiden zur Proteinexpression in eukaryotischen Zellen wurde die DNA Endotoxin-frei mit dem Komplettsystem *NucleoBond® Xtra Midi EF* isoliert.

### 2.2.8. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan 1983) hergestellt. Dazu wurde eine 5 ml ÜN-Kultur bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden 50 ml NZA Medium mit der ÜN-Kultur beimpft und bei 37 °C auf eine  $OD_{600}$  von ungefähr 0,5 angezogen. Anschließend wurde die Kultur 10 min auf Eis inkubiert. Eine Sedimentation der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 3000 g für 15 min und 4 °C. Das Zellpellet wurde dann in 15 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun in 4 ml RF2-Puffer resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

RF1-Puffer	
RbCl	100 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
KAc pH 5,8	30 mM
Glycerin	15 % (w/v)

RF2-Puffer	
MOPS pH 6,8	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
Glycerin	15 % (w/v)

### 2.2.9. Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente Zellen mit der gewünschten Menge DNA (1-10 µl) versetzt und ca. 20 min auf Eis inkubiert. Die DNA stammte entweder aus einer Plasmid Isolation (2.2.7) oder Ligation (2.2.4). Dann wurde für 1 min bei 42°C ein Hitzeschock durchgeführt und die Zellen anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die phänotypische Expression erfolgte für mindestens 90 min bei 37 °C nach Zugabe von 900 µl NZA Medium. Anschließend wurden entweder je 100 µl des Transformationsansatzes auf NZA-Agar ausplattiert oder der gesamte Transformationsansatz in flüssiges NZA Medium überführt. Die Medien enthielten das entsprechende Selektionsantibiotikum (Tab. 2.3).

### 2.2.10. Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Um die RNA aus eukaryotischen Zellen zu isolieren, wurde das *NucleoSpin® RNA II* Komplettsystem (Macherey-Nagel) verwendet. Hierzu wurden stets 10<sup>6</sup> Zellen pro Ansatz nach Herstellerangaben aufgeschlossen und die RNA isoliert. Anschließend wurde, wie vom Hersteller empfohlen, eine zweite DNA-Hydrolyse der gewonnenen Probe mittels DNase aus dem Komplettsystem durchgeführt. Die RNA wurde dann erneut, diesmal mit dem *NucleoSpin® RNA Clean-up* Komplettsystem (Macherey-Nagel), gereinigt. Nachdem die Konzentration der gewonnen RNA bestimmt war (2.2.3), wurde aufgrund der geringen Stabilität von RNA sofort eine cDNA Synthese angeschlossen (2.2.11). Die übrige RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 2.2.11. cDNA Synthese

Mit dem *Verso cDNA Synthesis* Komplettsystem (Thermo Fisher) wurde die isolierte RNA (2.2.10) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. In einen 20 µl Reaktionsansatz wurde je 1 µg RNA eingesetzt. Aus dem Komplettsystem wurden die *Anchored Oligo dT Primer* verwendet. Als Kontrolle wurde für jede RNA ein Reaktionsansatz ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Die angenommene Transkriptionseffizienz betrug 100 %, die finale Konzentration der cDNA somit 50 ng/µl.

### 2.2.12. Quantitative *Real-Time* PCR (qRT-PCR)

Eine Analyse der Expression einzelner Gene erfolgte auf Ebene der mRNA mittels qRT-PCR. Die RNA wurde zuvor aus eukaryotischen Zellen isoliert (2.2.10) und in cDNA umgeschrieben (2.2.11).

#### *Experimenteller Ablauf*

Im Rahmen der qRT-PCR konnte der cDNA Gehalt einer Probe mit dem DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* bestimmt werden. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben mit dem *ABsolute QPCR Mix SYBR Green* Komplettsystem (Thermo Fisher) in Triplikaten durchgeführt. Pro Reaktion wurden 20 ng cDNA eingesetzt. Als Kontrolle dienten Proben aus der cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase (2.2.11) und Proben mit *A. dest.*. Das verwendete qRT-PCR Programm ist in Tab. 2.17 dargestellt. Die Elongation der DNA und Auslesung der Fluoreszenz erfolgte jeweils bei drei Temperaturen (72, 80, 84 °C) im qRT-PCR Gerät *RotorGene 3000* (Corbett Research). Die Ergebnisse der Messung wurden mit der *Q-Gene* Software ausgewertet.

**Tab. 2.17 Programm der qRT-PCR Analyse am *RotorGene 3000* (Corbett Research)**

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	15 sec	42
Annealing	63 °C	30 sec	
Elongation / Messung	72 °C	30 sec	
	80 °C	15 sec	
	84 °C	15 sec	1
	40 °C	2 min	
	50 °C	1 min	
Schmelzkurve	50 – 99 °C	5 sec/°C	Gradient

#### *Auswertung*

Um die Expression eines Zielgens zu bestimmen wurde die Fluoreszenz der Proben nach jedem PCR Zyklus gemessen und die Hintergrundfluoreszenz der Zyklen 2 – 10 abgezogen. Anschließend wurde durch die *RotorGene* Software der Zyklus bestimmt, in dem die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert erreichte. Dieser Zyklus wird als C(T)-Wert bezeichnet. Der Schwellenwert wurde für alle Experimente auf 0,025 festgelegt. Allgemein wird dieser Schwellenwert schneller erreicht, wenn zu Beginn

der Reaktion mehr cDNA in der Probe vorhanden war. Um auszuschließen, dass Abweichungen durch eine unterschiedliche Qualität der Proben entstanden, wurde die Expression des Zielgens immer relativ zur Expression eines Referenzgens mit stabiler Expression berechnet (Pfaffl 2001). Als Referenzgene dienten in dieser Arbeit GAPDH und/oder das ribosomale Protein L13A (RibProtL13A). Die ermittelten C(T)-Werte wurden in die *Q-Gene* Software importiert. Um die normalisierte Expression (NE) des Zielgens zu bestimmen, wurde zusätzlich die Amplifikationseffizienz (*E*) der verwendeten *Primer* (Tab. 2.18) einbezogen:

$$NE = \frac{(E_{Ziel})^{C(T)_{Ziel}}}{(E_{Ref})^{C(T)_{Ref}}}$$

Die Methode der qRT-PCR erlaubt somit eine sehr sensitive Bestimmung der cDNA bzw. mRNA Menge des Zielgens.

#### *Primer-Design und Bestimmung der Amplifikationseffizienz*

Die Oligonukleotide (*Primer*), die für die PCR Reaktion benötigt wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit für jedes Zielgen eigens designt. Dabei wurden folgende Vorgaben berücksichtigt:

- Länge der *Primer*: 20 – 23 bp
- G/C-Gehalt: 40 – 60 %
- Schmelztemperatur: 57 – 60 °C
- Differenz der Schmelztemperatur eines *Primerpaares*: max. 2 °C
- Lage der *Primer*: Intron-übergreifend
- Länge des Amplikons: 90 – 150 bp

Jedes *Primerpaar* bestand aus einem *sense* und *antisense Primer* und wurde zunächst auf seine Effizienz getestet. Hierzu wurde ein cDNA Gemisch verschiedener cDNAs in 5 verschiedenen Konzentrationen (0,02, 0,05, 0,5, 5 und 50 ng) in die PCR-Reaktion eingesetzt. Mit Hilfe der *RotorGene* Software konnte in einem Diagramm der Logarithmus der Konzentration (Abszisse) gegen die gemessenen C(T)-Werte (Ordinate) aufgetragen werden. Die C(T)-Werte wurden für jedes *Primerpaar* in Abhängigkeit der Schmelzkurve bei einer bestimmten Temperatur ausgelesen (Tab.

2.18). Die Steigung ( $m$ ) der Geraden wurde über lineare Regression durch die Software bestimmt. Die Amplifikationseffizienz ( $E$ ) der Primer konnte dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{(-\frac{1}{m})}$$

Für weitere Experimente wurden nur spezifische Primer mit einer Effizienz zwischen 1,8 und 2,2 verwendet. Die Effizienzen und Auslesetemperaturen der verwendeten Primer (Tab. 2.8) sind in Tab. 2.18 dargestellt.

**Tab. 2.18 Effizienzen und Auslesetemperaturen der verwendeten qRT-PCR Primer (Tab. 2.8)**

<b><i>Primerpaar</i></b>	<b>Konzentration [mM]</b>	<b>Effizienz</b>	<b>Temperatur [°C]</b>
HTRA1	250	1,88	80
B-RAF	250	1,92	80
C-RAF	250	1,99	80
GAPDH	250	1,98	84
RibProtL13A	150	1,98	84

## 2.3. Zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Lösungen und Geräten unter einer Sterilbank durchgeführt. Der zellbiologische Abfall wurde vor der Entsorgung im Autoklaven (BeliMed) hitzesterilisiert (20 min, 120 °C, 2-3 bar).

### 2.3.1. Kultivierung und Passagierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte bei 37 °C in Brutschränken mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub>. SW480 Zellen wurden unter normalen Wachstumsbedingungen in *Roswell Park Memorial Institute-1640* Medium (RPMI) mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für HeLa Zellen wurde stattdessen das *Dublecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet. Alle Medien und Zusätze sind in 2.1.3 aufgeführt. Die Zellen wurden mittels PCR (2.2.1) in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen-Kontaminationen getestet. Um das Überwachsen der Zellen zu verhindern, wurden diese regelmäßig passagiert. Dazu wurde das Medium aus den Zellkulturschalen entfernt, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und 1/10 Volumen der üblichen Medium-Menge an Trypsin EDTA zu den Zellen gegeben. SW480 Zellen wurden anschließend 10 min, HeLa Zellen 5 min im Brutschrank inkubiert. War die Ablösung der Zellen nach mikroskopischer Überprüfung erfolgreich, wurden die Zellen in 9/10 Volumen Medium resuspendiert und Trypsin dadurch inaktiviert. Die Zellen wurden auf die gewünschte Zellzahl verdünnt und auf neue Zellkulturschalen überführt.

### 2.3.2. Auftauen eukaryotischer Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden auf Trockeneis transportiert und in einem 37 °C warmen Wasserbad zügig aufgetaut. In einem Schraubröhrchen wurden 3 ml Medium vorgelegt. Die aufgetauten Zellen wurden dann tropfenweise zum Medium gegeben und für 1 min inkubiert. Anschließend wurden weitere 6 ml Medium zugegeben und die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (1100 rpm, 5 min). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig in Medium resuspendiert und in die gewünschte Zellkulturschale überführt.

### 2.3.3. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Für eine langfristige Lagerung wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen mit warmem PBS gewaschen, mittels Trypsin EDTA von der Zellkulturschale gelöst (2.3.1) und sedimentiert (1100 rpm, 5 min). Die Zellen wurden in RPMI oder DMEM Medium mit 10 % (v/v) FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (2.3.4). Pro Kryogefäß wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen erneut sedimentiert und in 500 µl Lösung A resuspendiert. Im Anschluss wurden je 500 µl Lösung B tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellen in ein Kryogefäß überführt. Die Zellen wurden in Isopropanol gefüllten Einfrierboxen bei -80 °C langsam heruntergekühlt und nach 24 h in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Lösung A		Lösung B	
DMEM oder RPMI		DMEM oder RPMI	
FCS	50 % (v/v)	DMSO	20 % (v/v)

### 2.3.4. Bestimmung der Zellzahl und das Erstellen von Wachstumskurven

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem CountessII FL automatisierten Zellzähler (Lifetechnologies). Hierzu wurden 10 µl einer Zellsuspension in eine Zählkammer pipettiert, wobei die Kapillarkräfte für eine homogene Verteilung innerhalb der Zählkammer sorgten. Nach korrekter Einstellung des Fokus wurde die Anzahl der Zellen automatisch bestimmt. Um den Anteil lebender Zellen in der Suspension zu bestimmen, wurden 10 µl der Suspension vor der Messung mit 10 µl Trypanblau gemischt. Da Trypanblau die Membran lebender Zellen nicht durchdringen kann, konnte anhand der Färbung der prozentuale Anteil lebender Zellen bestimmt werden. Die Verdünnung der Zellsuspension wurde durch das Gerät automatisch herausgerechnet.

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausplattiert. Pro Zelllinie wurden 7 Wells vorbereitet. Über 168 h wurde alle 24 h die Zellen eines Wells mit Trypsin EDTA von der Platte gelöst (2.3.1) und gezählt. Die Anzahl Trypanblau-negativer Zellen jeder Probe wurde dreimal bestimmt und der Mittelwert gebildet. Das Wachstum der Zellen wurde auf diese Weise in mindestens drei unabhängigen Experimenten gemessen.

### 2.3.5. Herstellung von Proteinlysaten

#### *Proteinlysate für Western Blot-Analysen*

Für Western Blot-Analysen wurden Proteinlysate von SW480 Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen, wenn nicht anders vermerkt, mit kaltem PBS gewaschen und anschließend auf Eis und in kaltem PBS vorsichtig mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (1100 rpm, 5 min, 4 °C) und dann in kaltem Lysepuffer mit 1/25 Volumen des cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktails (Sigma-Aldrich) und je 1/100 Volumen der Phosphatase Inhibitor Cocktails 2 und 3 (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Der Inkubation in Lysepuffer auf Eis für 20 min folgte die Sedimentation der Zelltrümmer (16.000 g, 15 min, 4 °C). Die Proteinkonzentration des Lysates wurde nach Bradford bestimmt (2.4.4). Im Anschluss wurde das Proteinlysate mit Lysepuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt, mit 1/5 Volumen eines SDS-Probenpuffers (5x) und 30 mM DTT versetzt. Nach dem Erhitzen der Proben bei 95 °C für 5 min wurden die Proteinlysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse mittels Western Blot mit anschließender Immundetektion (2.4.8) bei -20 °C gelagert.

Lysepuffer		5x SDS-Probenpuffer	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM	Tris-HCl pH 6,8	1,5 mM
NaCl	150 mM	SDS	8 % (w/v)
NP40	1 % (v/v)	Glycerin	40 % (v/v)
Na-deoxycholat	0,5 % (w/v)	Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)		
EDTA	1 mM		

#### *Proteinlysate für die Proteom-Analyse*

Für die massenspektrometrische Analyse des Proteoms von SW480 Zellen (2.4.15) wurden Proteinlysate synchronisierter SW480 Zellen (2.3.8) hergestellt. Für jede Bedingung und Zelllinie wurden vier unabhängige biologische Replikate verwendet. Ein weiteres Replikat wurde mittels Durchflusszytometrie auf eine korrekte Synchronisation überprüft (2.3.9). Die gefrorenen Zellen wurden in 100 µl PBS + 8 M Urea resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Bioruptor® (Diagenode) für 15 min ultra-sonifiziert (1 min *Pulse*, 30 sec *Pause*, *High Voltage*, 4 °C). Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (20 min,



16.000 g, 4 °C) entfernt und die Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode bestimmt (2.4.4). Die Proteinlysate wurden schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### *Isolation von Proteinen aus Zellkulturüberständen*

Zur Analyse sekretierter Proteine mittels Western Blot wurden  $5 \cdot 10^5$  SW480 Zellen in die Wells einer 6-Well Platte ausplattiert. Nach 24 h wurde das normale RPMI Medium gegen Medium ohne FCS aber mit 1 % Penicillin/Streptomycin ausgetauscht. Die Zellen wurden für 96 h in diesem Serum freien Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und zentrifugiert (2000 g, 10 min, 4 °C), um schwimmende Zellen zu entfernen. Die, im Medium enthaltenen, Proteine wurden in einem Konzentrator (Vivaspin, Sartorius) mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa auf ein Volumen von ca. 20 µl konzentriert und dann mittels SDS-PAGE (2.4.5) und Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion (2.4.8) untersucht.

#### **2.3.6. Stimulation von SW480 Zellen mit EGF**

Um die ERK-Signalweg Aktivität in SW480 Zellen artifiziell zu stimulieren, wurden die Zellen mit dem humanen Epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) behandelt (Tab. 2.4). Hierzu wurden die Zellen zunächst für 24 h in RPMI Medium ohne FCS aber mit 1 % Penicillin/Streptomycin, im Folgenden als Serum freies Medium bezeichnet, inkubiert. Ein Serumentzug führt generell zu einer Reduktion der Signalweg Aktivität und erlaubt somit eine definierte Analyse der Signalweg Induktion. Zur Stimulation des Signalweges wurden 100 ng/ml EGF in Serum freiem Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge Essigsäure (10 mM) behandelt. Nach einer Inkubation mit EGF bei 37 °C für 5 bis 30 min wurden die Zellen geerntet und Proteinlysate für die Analyse mittels Western Blot hergestellt (2.4.8).

#### **2.3.7. Induktion von Zelltod und SubG1-Messung**

Die Quantifizierung toter Zellen in einer SW480 Zellpopulation wurde nach Nicoletti durchgeführt (Nicoletti *et al.*, 1991). Hierzu wurden zunächst  $2 \cdot 10^5$  Zellen in jedes Well einer 6-Well Platte ausgesät. Nach 24 h wurde den Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen für 72 h das DNA schädigende Agens 5-Fluoruracil (5-FU), der Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh Hydrat (Q-VD), der MEK-Inhibitor VII (MI) oder eine

Kombination der genannten Substanzen zugesetzt. Alle verwendeten Reagenzien sind in Tab. 2.4 aufgeführt. Die finale Konzentration der Reagenzien variierte je nach Versuch. Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Jede Bedingung wurde in jedem Experiment mindestens in Duplikaten analysiert. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit Trypsin EDTA geerntet (2.3.1). Dabei wurde auch der Überstand und die Waschlösung einer jeden Probe behalten, um abgerundeten und schwimmende Zellen in die Messung einzubeziehen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert und sofort in 300 µl HFS-Puffer (*hypotonic fluorochrome solution*) aufgenommen. Das enthaltene Triton X-100 bewirkte eine Freisetzung der Zellkerne aus den Zellen, während das enthaltene Propidiumiodid (PI) in die DNA interkalierte. Das Resuspendieren der Zellen erfolgte durch vorsichtiges Vortexen der Proben bei niedriger Geschwindigkeit. Die Proben wurden für 30 – 120 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend am MACSQuant VYB Durchflusszytometer (Miltenyi Biotech) gemessen. Für die Messung wurden 200 µl der Zellsuspension automatisch gemischt, aufgesogen und mit einer Flussrate von 500/s analysiert. Dubletten wurden aus der Messung ausgeschlossen. Es wurden mindestens 30.000 einzelne Zellkerne gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (Version 10.2) (2.1.11).

HFS-Puffer	
PI	50 µg/ml
Na-Citrat	0,1 % (w/v)
Triton X-100	0,1 % (v/v)
RNase	100 µg/ml

### 2.3.8. Synchronisation von SW480 Zellen

Für die Synchronisation wurden SW480 Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % kultiviert. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 4 mM Thymidin (Sigma-Aldrich) für 21 h (einzelner Thymidinblock) oder 24 h (doppelter Thymidinblock) in der S-Phase vor-synchronisiert. Für die Synchronisation in der M- und G1-Phase des Zellzyklus, wurden die Zellen nach einem einzelnen Thymidinblock für 4,5 h in normales Medium entlassen und anschließend mit 100 ng/ml Nocodazol (Sigma-Aldrich) behandelt. Nach 14 h wurden die mitotischen Zellen durch Schütteln und Klopfen von der Platte gelöst (*mitotic shake off*) und mittels Zentrifugation sedimentiert (1100 rpm, 5 min). Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und erneut sedimentiert. M-Phase Zellen

wurden sofort für die Analyse mittels Durchflusszytometrie fixiert (2.3.9) oder für die massenspektrometrische Analyse (2.3.5) als Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Um G1-Phase Zellen zu erhalten, wurden die mitotischen Zellen in RPMI Medium resuspendiert und auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausplattiert. Die Ernte der G1-Phase Zellen erfolgte nach 4 h mittels Trypsin EDTA (2.3.1). Für die G2- und S-Phase wurden die Zellen mit einem doppelten Thymidinblock (2x 4 mM Thymidin für je 24 h) mit einer 11 stündigen Pause synchronisiert. S-Phase Zellen wurden nach dem zweiten Thymidinblock für 3 h in normales Medium entlassen und anschließend mit Trypsin EDTA geerntet. Die G2-Phase Zellen wurden nach 3 h mit 10 µM eines CDK1-Inhibitors (RO-3306, Sigma-Aldrich) für 9 h behandelt, um den Eintritt der Zellen in die M-Phase zu verhindern (Vassilev 2006). Um eine Zellpopulation zu erhalten, die aus allen Zellzyklusphasen außer der S-Phase bestand, wurden die Zellen nach Behandlung mit dem CDK1-Inhibitor für 3 h (sh*HTRA1*) oder 5 h (shLV, p*HTRA1*, pLV) in normales Medium entlassen und anschließend mit Trypsin EDTA geerntet.

### **2.3.9. Zellzyklusmessung von SW480 Zellen mittels Durchflusszytometrie**

Um die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen innerhalb einer Zellpopulation zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst in Anwesenheit von 10 µM Bromodesoxyuridin (BrdU, Sigma-Aldrich) für 30 min inkubiert. Das Thymin-Analogon BrdU wird während der DNA-Replikation in die DNA eingebaut und kann somit zur Identifikation von S-Phase Zellen genutzt werden. Die Visualisierung der S-Phase Zellen erfolgte in einem späteren Schritt durch einen Antikörper gegen BrdU. Die Zellen wurden, falls nicht anders angemerkt, zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und mit Trypsin EDTA (1 ml, 10 min, 37 °C) geerntet. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (1100 rpm, 5 min), mit 5 ml PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 50 µl PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 450 µl kaltem Methanol ÜN bei -20 °C fixiert. Am nächsten Morgen wurde das Methanol nach Zentrifugation entfernt und die Zellen zweimal in kaltem PBS gewaschen. Um dem BrdU-Antikörper den Zugang an das integrierte BrdU zu ermöglichen, musste die zelluläre DNA denaturiert werden. Dazu wurden die Zellen in 500 µl 2 M Salzsäure (HCl) mit 0.5 % Triton X-100 (v/v) (Pierce) für 30 min bei 37 °C und 1000 rpm in einem Thermoblock inkubiert. Nach dreimaligem waschen der Zellen in PBS mit 0.01 % Triton

X-100 (v/v), wurde der pH-Wert der Proben mit pH-Papier überprüft. Die Proben wurden solange gewaschen, bis der pH-Wert neutral war. Danach wurden die Zellen für 1 h im Dunkeln bei 37 °C in 50 µl einer Antikörperlösung inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 1 h im Dunkeln bei 37 °C und 1000 rpm in 500 µl einer Propidiumiodidlösung (PI) inkubiert, um den DNA Gehalt der Zellen bestimmen zu können. Vor der Messung am MACSQuant VYB Durchflusszytometer (Miltenyi Biotech) wurden die Zellen über ein Zellsieb mit einer Porengröße von 30 µm gegeben. Für die Messung wurden 300 µl der Zellsuspension automatisch gemischt, aufgesogen und mit einer Flussrate von 500/s gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo (Version 10.2) (2.1.11). Für die Quantifizierung der Ergebnisse wurden ausschließlich Einzelzellen einbezogen.

Antikörperlösung in PBS	
Triton X-100	0,01 % (v/v)
BSA	1 % (w/v)
anti-BrdU-FITC	1/5 Volumen

Propidiumiodidlösung in PBS	
PI	25 µg/ml
Triton X-100	0,01 % (v/v)
RNase	10 µg/ml

### 2.3.10. Transfektion von SW480 Zellen

Die transiente Transfektion von SW480 Zellen mit rekombinanter DNA erfolgte mittels kationischer Lipide. Das verwendete Transfektionsreagenz war *Lipofectamine 2000* (Invitrogen/Thermo Fisher). Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 50 – 60 %. Die Menge von DNA und Transfektionsreagenz variierte je nach Experiment. Für die CLMS Analysen der Kolokalisation von HTRA1 und C-RAF (2.3.11) wurden  $1,5 \cdot 10^5$  SW480 Zellen in die Wells einer 12-Well Platte auf sterile Deckgläschen ausgesät. Bei einer Konfluenz von 50 % wurden die Zellen mit 1,25 µg DNA in 50 µl Opti-MEM Medium und 2,5 µl *Lipofectamine 2000* in 50 µl Opti-MEM Medium nach Herstellerangaben transfiziert. Nach 6 h wurde das Medium der Zellen gewechselt.

### 2.3.11. Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) wurde die Lokalisation von HTRA1Δmac und C-RAF in SW480 Zellen untersucht. Dazu wurden  $1,5 \cdot 10^5$  SW480 Zellen in die Wells einer 12-Well Platte auf sterile Deckgläschen ausgesät und wie beschrieben transient transfiziert (2.3.10). Um

eine Lokalisation von C-RAF und HTRA1 in Abwesenheit und Gegenwart von EGF beobachten zu können, wurden den Zellen 24 h nach Transfektion das Serum entzogen. Die Zellen wurden anschließend weitere 24 h in Serum freiem Medium kultiviert. Kurz vor der Fixierung erfolgte die Stimulation der Zellen mit EGF für 5 min bei 37 °C, welches in 2 mM Essigsäure gelöst war (2.3.6). Essigsäure diente deshalb als Kontrolle.

Nach Inkubation der Zellen mit EGF wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und durch eine Inkubation mit 3,7 % (v/v) Paraformaldehyd (PFA, Sigma-Aldrich) in PBS für 10 min bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurden die Zellen durch die Inkubation mit 0,1% (v/v) Triton-X 100 (Pierce) permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut für 5 min in PBS gewaschen und dann für 30 min mit 2 % BSA (w/v) (Sigma-Aldrich) in PBS bei RT inkubiert, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen C-RAF (RAF-1) erfolgte anschließend für 1 h im bei RT in einer dunklen Feuchtkammer. Hierzu wurde der Antikörper wie in Tab. 2.19 dargestellt in PBS mit 2 % BSA (w/v) verdünnt und 50 µl dieser Antikörperlösung auf jedes Deckgläschen pipettiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in neue 12-Well Platten überführt. Nach viermaligem Waschen in PBS für je 10 min wurden 500 µl einer Lösung bestehend aus PBS, 2 % BSA (w/v), dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:500) (Tab. 2.10) und DAPI (1:10.000) (Tab. 2.11) in die Wells gegeben und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert (). Dann wurden die Zellen erneut viermal je 10 min in PBS gewaschen und die Deckgläschen mittels *ProLong Gold Antifade* (Thermo Fisher) auf Objektträgern platziert. Nachdem die Präparate ausgehärtet waren, wurden diese bei 4 °C dunkel gelagert. Die Dokumentation erfolgte am Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop (Leica Microsystems) unter Verwendung eines Dioden-, Argon- und Helium-Neon-Lasers sowie eines Öl-Immersionsobjektivs mit 63x Vergrößerung. Die Anregung der Proben erfolgte bei 633, 594, 488 und 405 nm in dieser Reihenfolge. Zur Dokumentation wurde das Programm *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* verwendet, für die Auswertung das Programm Fiji (Tab. 2.16).

**Tab. 2.19 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung von SW480 Zellen**

<b>Zielstruktur Primärantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Konjugat Sekundärantikörper</b>
$\alpha$ -Tubulin	Maus, monoclonal	1:500	Alexa-633
RAF-1	Kaninchen, polyclonal	1:100	Alexa-488

### 2.3.12. Aufnahme von rekombinantem HTRA1 durch SW480 Zellen

Um die Aufnahme von rekombinantem HTRA1 $\Delta$ mac oder HTRA1 $\Delta$ PDZ-eGFP zu überprüfen, wurden  $8 \cdot 10^5$  SW480 in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät. Nach 24 h unter normalen Wachstumsbedingungen wurden dem Medium rekombinantes HTRA1 in Konzentrationen zwischen 5 – 300  $\mu$ g/ml Medium zugesetzt. Die Zeiträume der Inkubation variierten je nach Experiment. PBS diente dabei als Kontrolle. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin EDTA geerntet (10 min, 37 °C), um außen verbliebenes HTRA1 zu entfernen und dann wie beschrieben lysiert (2.3.5). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.5) und in einer Western Blot-Analyse (2.4.8) mit Antikörpern gegen HTRA1 oder eGFP immundetektiert (2.1.6).

Zusätzlich zur Western Blot-Analyse wurde die Aufnahme von HTRA1 $\Delta$ PDZ-eGFP durch CLSM analysiert (2.3.11). Hierzu wurden SW480 Zellen auch wie für die Kolokalisation beschrieben kultiviert, fixiert, gefärbt und gemessen. Statt der transienten Transfektion wurden die Zellen hier allerdings nach einem Serumentzug für 24 h mit 50  $\mu$ g HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP/ml Medium für 6 h inkubiert. Um die Lokalisation innerhalb der Zelle bestimmen zu können, wurde auch hier der Zellkern mit dem Farbstoff DAPI und das Zytoskelett der Zelle mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin und dem entsprechenden Sekundärantikörper gefärbt (Tab. 2.19).

## 2.4. Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1. Produktion rekombinanter Proteine und Zellaufschluss von *E. coli*

Zur heterologen Expression rekombinanter Proteine wurde in dieser Arbeit der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) Rosetta 2<sup>TM</sup> (2.1.1) verwendet, der ein Plasmid enthält, welches für seltene tRNA Codons kodiert. Die Zellen wurden wie beschrieben chemisch kompetent gemacht (2.2.8) und mit dem entsprechenden Plasmid (2.1.4) transformiert (2.2.9). Eine ÜN-Kultur mit Selektionsantibiotikum wurde mit dem Transformationsansatz beimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 9 - 12 l NZA Flüssigmedium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (Tab. 2.3) versetzt, mit der ÜN-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 beimpft und die Zellen bei 28 oder 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 mit 0,5 Isopropylthiogalaktosid (IPTG), da die verwendeten Plasmide einen T7-Promoter und ein *lac*-Operon enthielten. Inkubationszeit und Temperatur variierten je nach Protein. Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen sedimentiert (6.000 g, 10 min, 4 °C) und in 15 ml Lysepuffer/1 l Kultur resuspendiert. Der Lysepuffer variierte je nach Protein und enthielt 1/1000 Volumen DNase I. Ein Aufschluss der Zellen erfolgte mittels French Press in drei Durchläufen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation sedimentiert (50.000 g, 40 min, 4 °C) und der Überstand für die weitere Reinigung verwendet. Die erfolgreiche Expression des jeweiligen Proteins wurde mittels SDS-PAGE überprüft (2.4.5).

### 2.4.2. Reinigung von HTRA1Δmac

Die heterologe Produktion von HTRA1Δmac erfolgte wie beschrieben (2.4.1). Als Selektionsantibiotika wurden dabei Chloramphenicol und Ampicillin verwendet (Tab. 2.3), das Plasmid war pN-StrepII\_HTRA1dmac (Tab. 2.6). 9 l NZA-Flüssigmedium wurden bei 28 °C auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen und mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 4 h bei 28 °C.

Das Proteinlysate wurde im Lysepuffer über einen Superloop (GE Healthcare) mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min auf eine äquilibrierte Säule mit Strep-Tactin Superflow Material (IBA, 18 ml Säulenvolumen) geladen, um eine ausreichende Bindung des Proteins an das Säulenmaterial zu gewährleisten. Die Reinigung erfolgte

chromatographisch an einer FPLC-ÄKTA Anlage (GE Healthcare). Die Säule wurde zunächst mit 100 ml Lysepuffer und 100 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der Proteine mittels Elutionspuffer bis das UV Signal wieder die Basislinie erreichte. Ausgewählte Fraktionen der einzelnen Waschschrte und der Elution wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) analysiert. Jene Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und in einem Konzentrator (Vivaspin, Sartorius) mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa auf ein Volumen von ca. 2 ml konzentriert. Das Strep-Tactin Superflow Material wurde entsprechend der Herstellerangaben regeneriert und mehrfach wiederverwendet.

Das konzentrierte Proteinlysate wurde in einem zweiten Schritt mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt. Um Aggregate zu entfernen, wurde das Lysat zentrifugiert (16.000 g, 10 min, 4 °C) und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min auf eine, in Gelfiltrationspuffer äquilibrierte, GE Hiload 26/60 Superdex 200 Chromatographiesäule (GE Healthcare) aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen wurden erneut mittels SDS-PAGE analysiert. Jene Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und in einem Konzentrator (Vivaspin, Sartorius) mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa konzentriert. Die Konzentration der Proteinlösung wurde bestimmt (2.4.4). Das gereinigte HTRA1 wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<b>Lysepuffer</b>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	300 mM
<b>Elutionspuffer</b>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	300 mM
Desthiobiotin	2,5 mM

<b>Waschpuffer</b>	
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
NaCl	1 M
<b>Gelfiltrationspuffer</b>	
HEPES-NaOH pH 7,5	10 mM
NaCl	150 mM

### 2.4.3. Reinigung von HTRA1ΔPDZ-eGFP

Die heterologe Produktion von HTRA1ΔPDZ-eGFP erfolgte wie zuvor beschrieben (2.4.1). Als Selektionsantibiotika wurden dabei Chloramphenicol und Ampicillin verwendet (Tab. 2.3), das verwendete Plasmid war pET21d\_HTRA1protSA-eGFP (Tab. 2.6). 6 l NZA-Flüssigmedium wurden bei 37 °C auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 angezogen und mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 5 h bei 24 °C.



Das Proteinlysats mittels Affinitätschromatographie im *Gravityflow*-Verfahren gereinigt. Hierzu wurde, in Lysepuffer äquilibriertes, Protino NiTED-Material (Macherey-Nagel) verwendet. Das Proteinlysats wurde ÜN bei 4 °C mit dem Protino NiTED-Material auf einem Rollenmischgerät (Hecht-Assistent) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Gemisch auf die Säule geladen. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gebracht. Die Säule wurde zunächst drei Mal mit 3 ml Lysepuffer und einmal mit 3 ml Waschpuffer gewaschen. Gebundenes HTRA1 wurde durch Imidazol von der Säule eluiert (4x 4 ml Elutionspuffer). Proben der Wasch- und Elutionsschritte wurden mittels SDS-PAGE analysiert (2.4.5). Jene Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden vereinigt und in einem Konzentrator (Vivaspin, Sartorius) mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa auf ein Volumen von 3 ml konzentriert. Das Protino NiTED-Material wurde entsprechend der Herstellerangaben regeneriert und mehrfach wiederverwendet.

In einem zweiten Schritt wurde das konzentrierte Proteinlysats mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt. Das Lysats wurde zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen (16.000 g, 10 min, 4 °C) und dann mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min auf eine, in Gelfiltrationspuffer äquilibrierte, GE Superdex 200 10/300 GL Chromatographiesäule (GE Healthcare) aufgetragen. Ausgewählte Fraktionen wurden wieder mittels SDS-PAGE analysiert. Jene Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und in einem Konzentrator (Vivaspin, Sartorius) mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa konzentriert. Nach einer Konzentrationsbestimmung (2.4.4) wurde das gereinigte Protein aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<b>Lysepuffer</b>	
Na-Phosphat pH 7,4	20 mM
NaCl	150 mM
<b>Elutionspuffer</b>	
Na-Phosphat pH 7,4	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazol	250 mM

<b>Waschpuffer</b>	
Na-Phosphat pH 7,4	20 mM
NaCl	1 M
<b>Gelfiltrationspuffer</b>	
PBS	Invitrogen/Thermo Fisher

#### 2.4.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurde nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des Roti®-Nanoquant Komplettsystems (Carl Roth). Dazu wurden 50 µl einer verdünnten Proteinprobe mit 200 µl Bradford Reagenz (1x) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die OD<sub>590</sub> und die OD<sub>450</sub> an einem Spektrophotometer gemessen und deren Quotient bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde durch den Vergleich mit einer zuvor angefertigten BSA Eichgerade (1 µg/ml bis 100 µg/ml) ermittelt. Für Proteinlysate aus eukaryotischen Zellen musste der Puffer der Eichgerade an den verwendeten Lysepuffer angepasst werden.

#### 2.4.5. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelectrophoresis*). Das Sammelgel enthielt 6 % Acrylamid. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels variierte je nach Art der Probe zwischen 10 % und 15 %. Die analysierten Proben wurden mit 1/5 Volumen eines 5x SDS-Probenpuffers und wahlweise 30 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt. Die Proteine wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend bei einer konstanten Spannung von 150 V in 1x Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Eine Visualisierung der Proteine erfolgte mit einer Coomassie-Färbung (2.4.6), Silberfärbung (2.4.7) oder in einer Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion (2.4.8).

SDS-Trenngelpuffer	
Tris-HCl pH 8,8	1,5 mM
SDS	0,4 % (w/v)

10x Elektrophoresepuffer	
Tris-HCl pH 8,8	333 mM
SDS	1 % (w/v)
Glycin	1,92 M

Acrylamid	
Rotiphorese Gel	30

SDS-Sammelgelpuffer	
Tris-HCl pH 6,8	1,5 mM
SDS	0,4 % (w/v)

5x SDS-Probenpuffer	
Tris-HCl pH 6,8	1,5 mM
SDS	8 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)

#### 2.4.6. Coomassie-Färbung

Proteine, die mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt wurden, konnten mit Coomassie-Brillant-Blau unspezifisch angefärbt werden. Die Polyacrylamidgele wurden dazu für 30 sec in Puffer A in einer Mikrowelle erhitzt (400 W) und anschließend für 5 min auf einem Kippschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gele für je 30 sec nacheinander in Puffer B, C und D erhitzt. Dabei wurden die Lösungen B und C verworfen. Abschließend wurden die Gele bis zum gewünschten Grad in Puffer D entfärbt.

Puffer A	
Isopropanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie R250	0,05 % (w/v)

Puffer C	
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie R250	0,002 % (w/v)

Puffer B	
Isopropanol	10 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie R250	0,005 % (w/v)

Puffer D	
Essigsäure	10 % (v/v)

#### 2.4.7. Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Blum (1987) ermöglicht eine sehr sensitive Detektion von niedrig konzentrierten Proteinmengen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für eine Silberfärbung 3 - 8 % Tris-Acetat (TA) Gele (Invitrogen) verwendet. Der Elektrophoresepuffer für diese Gele war gekühlter 1x TA-Puffer. Die zu färbenden Polyacrylamidgele (2.4.5) wurden für 30 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend zwei Mal für je 10 min in 30 % Ethanol (v/v) und einmal in *A. dest.* gewaschen. Danach wurden die Gele exakt 1 min in 0,02 % Thiosulfatlösung (w/v) inkubiert und drei Mal kurz (3 x je 20 sec) mit *A. dest.* gewaschen. Anschließend wurden die Gele für 20 min in einer Silbernitratlösung geschwenkt und drei Mal in *A. dest.* gewaschen (3 x je 20 sec). Die folgende Inkubation der Gele in Entwicklerlösung wurde bei deutlicher Färbung durch einmaliges kurzes Waschen mit *A. dest.*, eine Inkubation in 5 % Essigsäure (v/v) für 10 min und erneutes Waschen in *A. dest.*, für 10 min beendet. Alle Inkubationen erfolgten bei RT.

10x TA-Puffer		Fixierlösung	
Tricin	500 mM	Ethanol	40 % (v/v)
Tris-HCl pH 8,24	500 mM	Essigsäure	10 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)	Formaldehyd (37 %)	500 µl/l
Silbernitratlösung		Entwicklerlösung	
Silbernitrat	0,2 % (w/v)	Natriumcarbonat	3 % (w/v)
Formaldehyd (37 %)	750 µl/l	Natriumthiosulfat	0,0004 % (w/v)
		Formaldehyd (37 %)	500 µl/l

#### 2.4.8. Western Blot-Analyse und Immundetektion

Zur spezifischen Detektion einzelner Proteine wurden diese im Anschluss an eine SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran (Amersham) übertragen. Als Proteinstandard wurde der *Prestained protein standard* (BioRad) verwendet (Tab. 2.14). Je nach Protein wurde dafür entweder das *Semidry* oder *TankBlot* Verfahren verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 1 min in 100 % Methanol (v/v) aktiviert. Dann wurden die Membran, das Gel und das verwendete *Whatman* Papier mindestens 10 min in dem entsprechenden Transferpuffer äquilibriert. Im *Semidry* Verfahren erfolgte der Transfer bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h in 1x Transferpuffer mit 20 % Methanol (v/v), im *TankBlot* Verfahren bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA für 30 min in 1x Transferpuffer mit 10 % Methanol (v/v). Die verwendeten Transferapparaturen wurden von der Firma BioRad bezogen. Ein erfolgreicher Transfer der Proteine wurden durch Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft. Dazu wurde die Membran für 5 min in 1x Ponceau S inkubiert und dann kurz mit *A. dest.* abgespült. Proteine färbten sich rosa. Anschließend wurde die Membran solange mit *A. dest.* gewaschen, bis die Färbung verschwunden war.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde die Membran für mindestens 1 h in TBS-T mit 5 % Magermilchpulver (w/v) oder 3 % BSA (w/v) bei RT inkubiert. Welche Blockierlösung verwendet werden musste, wurde für jeden Primärantikörper getestet (Tab. 2.9). Die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen das Zielprotein erfolgte in der entsprechenden Blockierlösung ÜN bei 4 °C auf einem Horizontalschüttler. Am nächsten Morgen wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen (je 10 min) der Membran in TBS-T entfernt. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tab. 2.10) in Blockierlösung inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden erneut durch dreimaliges Waschen (je

10 min) der Membran in TBS-T entfernt. Sofern nicht anders vermerkt waren die Sekundärantikörper direkt mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert. Die Entwicklung dieser Membranen erfolgte nach einem weiteren Waschschrift in AP-Puffer (5 min) durch die Inkubation in Entwicklerlösung mit einem AP-Substrat bis zum gewünschten Färbegrad. Wurde ein Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter Zweitantikörper verwendet, erfolgte die Entwicklung der Membran nach weiteren Waschschriften mit TBS (2x je 10 min) mit dem ECL Pico oder Femto Komplettsystem (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben. Im Anschluss an die Entwicklung wurden die Membranen ausgiebig in *A. dest.* gewaschen und getrocknet. Alle verwendeten Antikörper sind in Tab. 2.9 und Tab. 2.10 aufgeführt.

<b>Transferpuffer</b>	
Tris-HCl pH 8,3	15 mM
Glycin	120 mM
SDS	0,2 % (w/v)

<b>TBS-T</b>	
Tris-HCl pH 7,5	30 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,1 % (v/v)

<b>Entwicklerlösung</b>	
Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NBT	3,3 g/10 ml (in DMF)
BCIP	1,65 g/10 ml

<b>TBS</b>	
Tris-HCl pH 7,5	30 mM
NaCl	150 mM

<b>AP-Puffer</b>	
Tris-HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

#### 2.4.9. Co-Immunpräzipitation

Um eine Interaktion von HTRA1 mit Proteinen des ERK-Signalweges zu untersuchen, wurde die Methode der Co-Immunpräzipitation (IP) verwendet. Dazu wurden Proteinlysate von SW480 Zellen hergestellt wie in 2.3.5 beschrieben, jedoch mit einem anderen Lysepuffer (Cell Lysis Buffer (10x), Cell signaling). Die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 15 cm wurden dabei in 150 µl des Lysepuffers (1x) aufgenommen. Jedes Lysat wurde mit 75 µl magnetischer Protein G-Beads vorab für 2 h bei 4 °C inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Die Konzentration der Proteinlysate wurde nach Entfernung der Beads nach Bradford bestimmt (2.4.4). Als Kontrolle wurden 200 µg Proteinlysat

aufgehoben. Nach Verdünnung der Proteinlysate auf eine Konzentration von 1 mg/150 µl in Lysepuffer, wurden diese mit je 1 µg eines Antikörpers gegen B-RAF, C-RAF, MEK, K-RAS oder N-RAS, sowie der gleichen Menge einer passenden Isotypkontrolle aus Maus und Kaninchen über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tab. 2.9). Am nächsten Morgen wurden äquilibrierte *Beads* zu den Lysaten gegeben, welche an die konstante Region von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) binden und für 1,5 h bei 4 °C auf einem Rührschüttler mit den Lysaten inkubiert. Mit Hilfe eines *magnetic particle concentrator* wurden die *Beads*, die daran immobilisierten Antikörper und gebundenen Proteine im Reaktionsgefäß gehalten. Ungebundene Proteine wurden in drei Waschschritten mit 500 µl Waschpuffer (je 5 min bei 4 °C) entfernt. Durch Erhitzen der Proben in SDS-Probenpuffer (2x) mit 100 mM DTT bei 95 °C für 10 min wurden die Bindungen zwischen *Beads*, Antikörpern und Proteinen gelöst. Die *Beads* wurden mit dem *magnetic particle concentrator* entfernt, die isolierten Proteine im Anschluss mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und in einer Western Blot-Analyse immundetektiert (2.4.8). Bei dem verwendeten Sekundärantikörper zur Detektion von HTRA1 handelte es sich um einen konformationsspezifischen Antikörper (Tab. 2.10), der nur jene Primärantikörper detektierte, die an die PVDF Membran gebunden waren. Die denaturierten Primärantikörper, die für die IPs verwendet wurden, wurden von diesem Sekundärantikörper nicht erkannt. Das war von entscheidender Bedeutung, um unspezifische Signale zu vermeiden, da die schwere Kette der Antikörper auf etwa der gleichen Höhe detektiert wird (ca. 50 kDa) wie endogenes HTRA1. Der Ablauf einer IP ist schematisch in Abb. 3.4 dargestellt.

Waschpuffer	
Na-Phosphat pH 7,4	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)

5x SDS-Probenpuffer	
Tris-HCl pH 6,8	1,5 mM
SDS	8 % (w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)

#### 2.4.10. *Pulldown* Experimente

Um eine Interaktion von HTRA1 mit Proteinen des ERK-Signalweges zu analysieren, wurde als zweite Methode *Pulldown* Experimente (PD) durchgeführt. Hierzu wurden inaktives rekombinantes HTRA1Δmac(S328A) und HTRA1ΔPDZ(S328A) verwendet, die an einen doppelten Strep-Tag fusioniert waren (Tab. 2.12). Pro PD wurden 70 µg HTRA1 (0,7 mg/ml) für 1 h bei 4 °C an 100 µl magnetische Streptactin-*Beads*

(*PureCube HiCap StrepTactin MagBeads, Cube Biotech*) immobilisiert. Für die PD Experimente wurden Proteinlysate von pLV Zellen hergestellt wie in 2.3.5 beschrieben, jedoch mit dem unten aufgeführten Lysepuffer. Die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 15 cm wurden dabei in 500 µl Lysepuffer resuspendiert. Als Kontrolle wurden 50 µl Proteinlysate aufgehoben. Die restlichen 450 µl Proteinlysate wurden 1 h bei 4 °C auf einem Rührschüttler mit dem immobilisierten HTRA1 inkubiert. Zur Kontrolle wurden auch die Streptactin-Beads alleine mit dem Zelllysate inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden dann durch einmaliges Waschen mit Lysepuffer und dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Über einen *magnetic particle concentrator* wurden die immobilisierten Proteine dabei im Reaktionsgefäß gehalten. Dann wurden die Proben in SDS-Probenpuffer (2x) mit 100 mM DTT bei 95 °C für 10 min erhitzt. Die Beads wurden mit dem *magnetic particle concentrator* entfernt, die isolierten Proteine im Anschluss mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und in einer Western Blot-Analyse immundetektiert (2.4.8). Der Ablauf eines PD Experimentes ist in Abb. 3.5 dargestellt.

Lysepuffer	
HEPES pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
NP40	0,5 % (v/v)

Waschpuffer	
HEPES pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

#### 2.4.11. Aktivitätsbestimmung von HTRA1 durch die Hydrolyse von Proteinen

Um die Aktivität von HTRA1 gegenüber verschiedenen Substraten zu testen, wurde rekombinant gereinigtes HTRA1 gemeinsam mit dem Substrat im Verhältnis 1:10 (1 µM:10 µM) oder 1:5 (0,5 µM:2,5 µM) bei 37 °C in Tris-Puffer oder Phosphatpuffer inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach der Geschwindigkeit, mit der das Substrat proteolysiert wurde. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) entnommen.

Tris-Puffer	
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	150 mM

Phosphat-Puffer	
Na-Phosphat pH 7,4	150 mM
NaCl	380 mM

#### 2.4.12. Aktivitätsbestimmung von HTRA1 durch die Hydrolyse eines pNA-Substrates

Eine quantitative Methode die proteolytische Aktivität von HTRA1 zu bestimmen, ist die Proteolyse von synthetischen Peptiden gekoppelt an eine an eine para-Nitroanilin-Gruppe (pNA). Eine Abspaltung der pNA-Gruppe führt zu einer Erhöhung der Absorption bei 405 nm und kann somit spektrophotometrisch quantifiziert werden. HTRA1 (1 µM) wurde 10 min bei 37 °C in Tris-Puffer inkubiert. Dann wurde und das Substrat VFNTLPMMGKASPV-pNA im Verhältnis 1:500 (500 µM) zugegeben. Die Absorption wurde über 120 min jede Minute am Spektrophotometer Genios Pro (Tecan) oder Spektrophotometer SpectraMax M5 (Molecular Devices) gemessen. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Als Kontrolle dienten Proben ohne HTRA1 und ohne das Substrat. Die Hintergrundabsorption der Probe ohne HTRA1 wurde von allen Messwerten subtrahiert. Anschließend wurde die spezifische Aktivität von HTRA1 mit der folgenden Formel über den linear ansteigenden Bereich jeder Kurve einzeln berechnet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta A_{405} \times V}{m \times \varepsilon \times t}$$

$\Delta A_{405}$ : Absorptionsänderung bei  $\lambda = 405$  nm über den Zeitraum t (in min)

V: Endvolumen des Reaktionsansatzes [ml]

m: Menge des Enzyms im Reaktionsansatz [mg]

$\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient des pNA-Substrates (8 800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

t: Messzeitraum [min]

Tris-Puffer	
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	150 mM



### 2.4.13. Analytische Größenausschlusschromatographie

Um die Bildung eines HTRA1-C-RAF-RBD Komplexes (3.3.2) oder die oligomeren Zustände verschiedener HTRA1 Mutanten (3.7.2) zu untersuchen, wurde die analytische Größenausschlusschromatographie (SEC) verwendet. Hierfür wurden die Proteine mit einer Konzentration von 100  $\mu$ M bei 4 °C auf eine äquilibrierte Chromatographiesäule (GE Superdex 200 3.2/300) geladen. Für die HTRA1-C-RAF-RBD Komplexbildung wurde Bicin-Puffer, für die oligomeren Zustände der HTRA1 Mutanten Tris-Puffer verwendet. Die Messung der Proben erfolgte an der FPLC-Anlage ÄKTAmicro (GE Healthcare). Fraktionen der gemessenen Peaks wurden anschließend mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und durch eine Silberfärbung (2.4.7) visualisiert. Eine Kalibrierung der verwendeten Chromatographiesäule mit dem FPLC Gelfiltration LMW&HMW Standard (Bio-Rad) (Tab. 2.14) im gleichen Puffer ließ eine Berechnung der ungefähren Größen der eluierten Proteine zu.

<b>Bicin-Puffer</b>	
Bicin pH 9	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

<b>Tris-Puffer</b>	
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	150 mM

### 2.4.14. Crosslink Methode

Zur Bestimmung des oligomeren Zustandes CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten wurde die *Crosslink* Methode verwendet. Die Proteine wurden dazu in HEPES-Puffer für 10 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der *Crosslinker* Glutaraldehyd (GA) in einer finalen Konzentration von 0,5 % (v/v) zu den Proteinen gegeben. Die Vernetzung der Lysine wurde nach 2 min durch Zugabe von 1/5 Volumen der Stopplösung beendet (10 min). Die Proben wurden für 10 min bei 40°C in SDS-Probenpuffer ohne DTT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE Novex Midi Gel, Invitrogen) und durch eine Silberfärbung (2.4.7) visualisiert.

<b>HEPES-Puffer</b>	
HEPES pH 7,5	50 mM
NaCl	120 mM

<b>Stopplösung</b>	
Tris-HCl pH 8	1 M

#### 2.4.15. Massenspektrometrische Analyse des SW480-Proteoms

Aus synchronisierten SW480 Zelllinien (2.3.8) wurden Proteinlysate hergestellt (2.3.5). Die Konzentration wurde im Anschluss auf 0,5 µg/µl eingestellt. Die Proteine wurden durch Zugabe von DTT reduziert (5 mM, 37 °C, 30 min) und danach durch Zugabe von Iodacetamid (IAM) alkyliert (20 mM, 30 °C, 30 min). Um überschüssiges IAM zu inaktivieren wurde DTT in einer finalen Konzentration von 25 mM zugegeben. Die Hydrolyse der Proteine erfolgte anschließend mit 830 ng Lys-C (1/30 Volumen, Wako Laboratory Chemicals) für 3 h bei 37 °C. Die Proben wurden anschließend in ABC-Puffer verdünnt, sodass die Urea Konzentration 1 M war. Dann wurden die Proteine erneut hydrolysiert, diesmal durch Zugabe von 830 ng Trypsin (1/30 Volumen, Promega) ÜN bei 37 °C bei 800 rpm. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 0,5 % (v/v) PFA beendet. Die entstandenen Peptide wurden dann über C-18 Säulen entsalzt () und anschließend in einem Vakuum-Concentrator (Eppendorf) getrocknet. Kurz vor der Messung wurden die Proben in 10 µl PFA 0,1 % (v/v) gelöst. Die Messung erfolgte an einem Orbitrap Elite Instrument (Thermo Fisher) gekoppelt an ein EASY-nLC 1000 Flüssigchromatographie (LC) System mit einer Nanospray Flex-Ion Ionenquelle (Thermo Fisher). Die Aufbereitung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Svenja Blaskowski (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland). Die Messung der Proben und Identifikation der Peptide mit der MaxQuant Software erfolgte im Anschluss durch Dr. Farnusch Kaschani (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland) (für detailliertere Informationen siehe Schillinger *et al.*, *submitted*). Die ungefilterten Ergebnisse dieser Datenbanksuche wurden in die sogenannte PRIDE (*PR*oteomics *ID*entifications) Datenbank hochgeladen (proteinGroups.txt und peptide.txt). Die *label-free quantification* (LFQ) Intensitäten der Proteine wurden ebenfalls mit der MaxQuant Software ermittelt. Eine weitere Auswertung der Daten erfolgte mit der Persues computational platform (version 1.5.6.0.) (Tab. 2.16). Proteine die in der *contaminants* oder *reversed database* auftauchten, sowie solche die als *only identified by site* markiert waren, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Von den übrigen Proteinen wurden nur solche für die weitere Auswertung verwendet, die in mindestens 3 von 4 Replikaten in mindestens einer Bedingung identifiziert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Perseus Software oder dem *GOrilla online tool* (Tab. 2.16) wie in den Ergebnissen beschrieben (3.5).

---

## 2.5. Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 (Tab. 2.16). Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem D'Agostino und Pearson Omnibus Test oder (für kleinere „n“) mit dem Komologrov Smirnov Test mit einem Alpha = 0,05 durchgeführt. Normalverteilte Datensätze wurden mit einem zweiseitigen t-Test (2 Testgruppen) oder Ein-Weg-ANOVA mit Tukey *post-hoc*-Test (mehr als 2 Testgruppen) analysiert, wenn eine Varianzgleichheit (Alpha = 0,05) gegeben war. Datensätze, die keiner Normalverteilung folgten oder deren Varianzen sich signifikant unterschieden, wurden mit einem Mann-Whitney-U-Test (2 Testgruppen) oder Kruskal-Wallis mit Dunns *post-hoc*-Test (mehr als 2 Testgruppen) analysiert.

Die statistische Auswertung der massenspektrometrischen Analyse erfolgte separat mittels Perseus Software und *GOrilla online tool* (Tab. 2.16) wie in den Ergebnissen beschrieben (3.5).

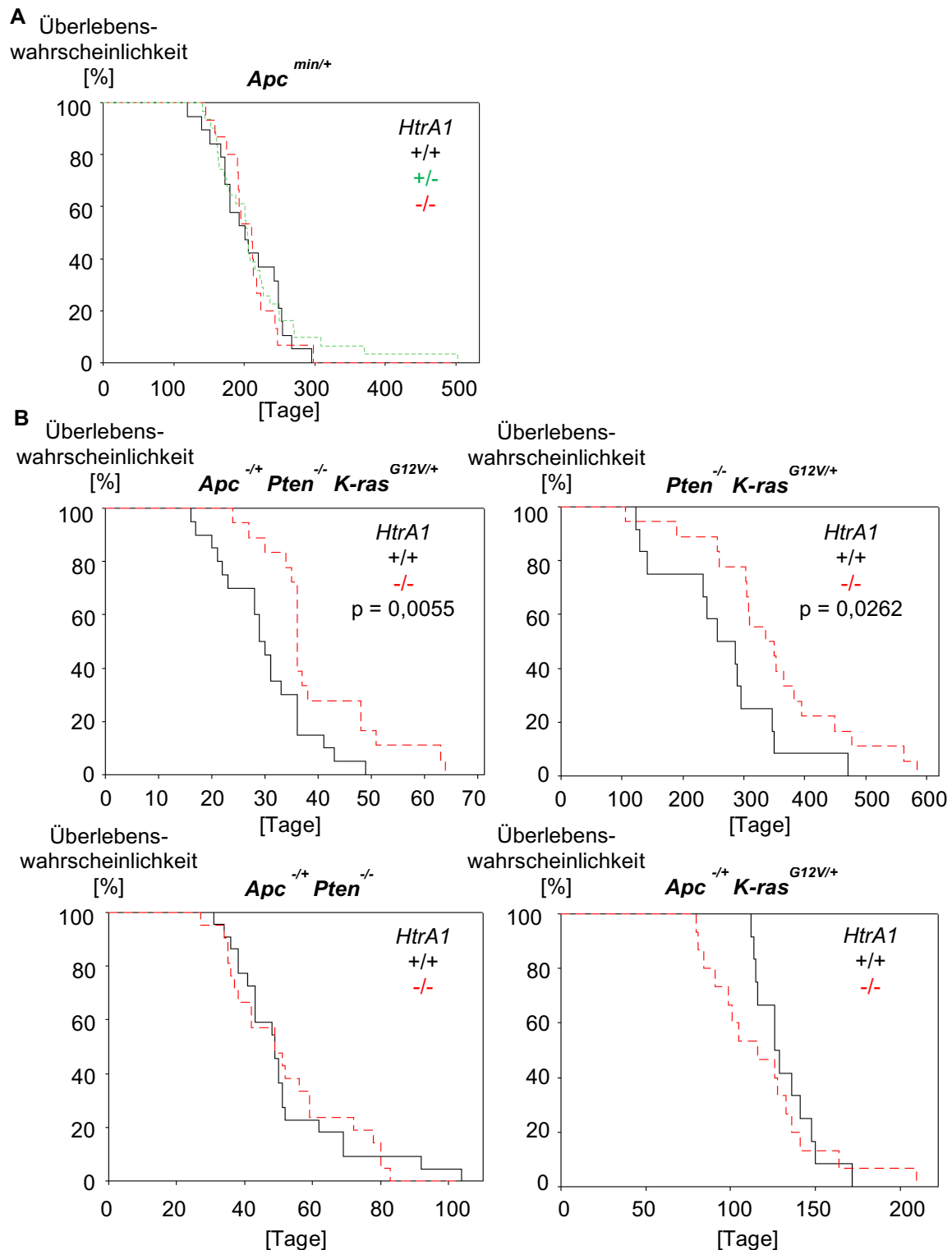
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Der Einfluss von Htra1 auf aggressive Tumor-Mausmodelle

Vor Beginn dieser Arbeit wurde in Kooperation mit der *Cardiff School of Biosciences* eine *in vivo* Studie durchgeführt, die den Einfluss von Htra1 in der Entstehung von Kolonkarzinomen näher untersuchen sollte<sup>4</sup>. Hierzu wurde ein etabliertes Tumor-Mausmodell verwendet (Moser *et al.*, 1990). Das sogenannte *Apc*<sup>min/+</sup> Mausmodell trägt eine heterozygote Mutation des Tumorsuppressorgens *Apc*. Mutierte Mäuse entwickeln bis zu 100 Neoplasien im Dünndarm, zusätzlich zu Tumoren im Bereich des Dickdarms. In Neoplasien dieser Mäuse wurde eine ca. 3,5-fach erhöhte Expression des *Htra1* Gens beobachtet. Ein homozygoter (-/-) oder heterozygoter (-/+) *Knockout* des *Htra1* Gens hatte keinen signifikanten Effekt auf die mittlere Überlebensdauer der Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen (+/+) (Abb. 3.1A). Anschließend wurden vier weitere aggressive Tumor-Mausmodelle untersucht, in denen durch Verwendung eines *Cre/Lox* Systems in vier Kombinationen ein heterozygoter *Knockout* von *Apc* (*Apc*<sup>-/+</sup>), ein homozygoter *Knockout* des Tumorsuppressors *Pten* (*Pten*<sup>-/-</sup>) und eine heterozygote *K-ras* Mutation (*K-ras*<sup>G12V/+</sup>) induziert wurden (Davies *et al.*, 2014). Die *Cre*-Rekombinase vermittelte homologe Rekombination an den LoxP-Stellen wurde durch die intraperitoneale Gabe von Tamoxifen lokal im Darm der Mäuse induziert. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigte, dass ein *Knockout* von *Htra1* in zwei von vier untersuchten Modellen das Überleben der Mäuse signifikant um ca. 33 % verlängert (Abb. 3.1B). Htra1 zeigte in diesem Experiment somit keine tumorsuppressiven Eigenschaften (siehe 1.4.1). Der protektive Effekt von Htra1 auf das Überleben der Mäuse war nur zu beobachten, wenn *Pten* deletiert und *K-ras* mutiert war (*Pten*<sup>-/-</sup>*K-ras*<sup>G12V/+</sup>). Die Phosphatase Pten inhibiert z.B. den PI3K/AKT- oder ERK-Signalweg, indem sie beteiligte Kinasen de-phosphoryliert (Maehama und Dixon 1998, Vivanco *et al.*, 2007, Bouali *et al.*, 2009). Die experimentellen Daten der *in vivo* Studie lassen daher vermuten, dass die protektive Wirkung von Htra1 abhängig von einer K-ras Aktivierung und Pten Inhibition ist und Htra1 in Verbindung zu K-ras vermittelten Signalwegen steht.

---

<sup>4</sup> Die Experimente wurde von Kirsty Greenow, Alan R. Clarke und Kollegen (Cardiff University, Cardiff, UK) durchgeführt

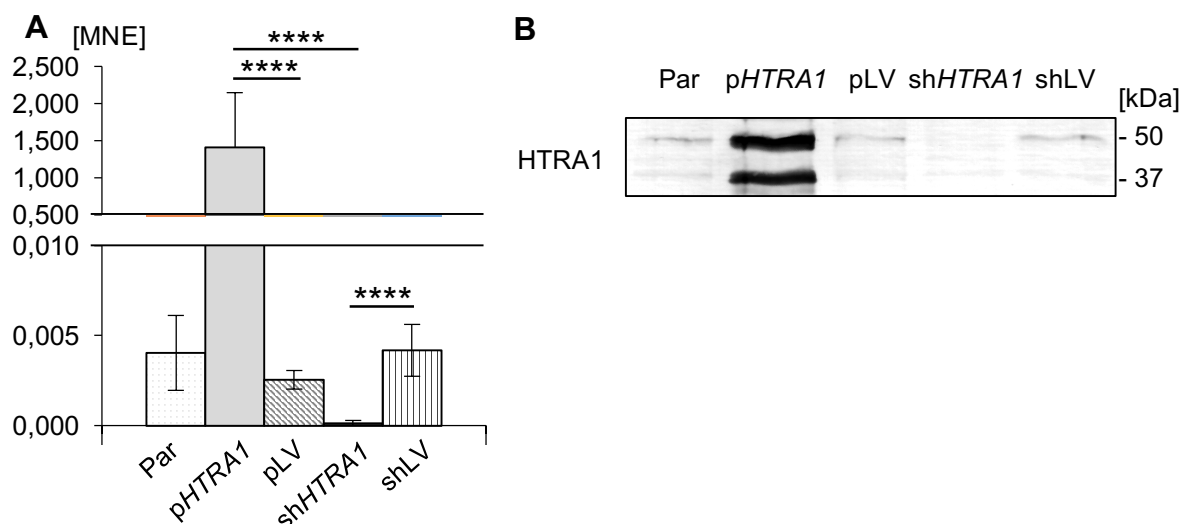


**Abb. 3.1 Das Überleben von aggressiven Tumor-Mausmodellen in Abhängigkeit von Htra1**

Gezeigt sind die Kaplan-Meier-Kurven von fünf unterschiedlichen experimentellen Kohorten und den passenden Kontrollgruppen (unveröffentlichte Daten Kirsty R. Greenow und Alan R. Clarke). Die zugrundeliegenden Genotypen sowie der *Htra1* Hintergrund sind angegeben. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Mäuse ist in Tagen und Prozent abgebildet. **A)** Dargestellt ist der Einfluss von *Htra1* auf das Überleben *Apc*<sup>min/+</sup>-Mäusen. **B)** Gezeigt ist der Einfluss von *Htra1* auf das Überleben von *Apc*<sup>-/+</sup>*Pten*<sup>-/-</sup>*K-ras*<sup>G12V/+</sup>-Mäusen, *Pten*<sup>-/-</sup>*K-ras*<sup>G12V/+</sup>-Mäusen, *Apc*<sup>-/+</sup>*Pten*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Apc*<sup>-/+</sup> *K-ras*<sup>G12V/+</sup>-Mäusen.

### 3.2. Die humane Zelllinie SW480 als experimentelles System

Um die Ursache für den beschriebenen protektiven Effekt des *Htra1* Knockouts auf das Überleben von Mäusen mit aggressiven Tumoren zu untersuchen (3.1), wurde ein geeignetes experimentelles System gesucht. Die Wahl fiel auf die humane Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 (Leibovitz *et al.*, 1976). Diese etablierte Zelllinie weist die gleiche *K-RAS* Mutation (G12V) auf, die im Kolon der Mäuse induziert wurde. Dies war für die Wahl des experimentellen Systems von entscheidender Bedeutung, da der protektive Effekt von *Htra1* nur zu beobachten war, wenn *K-ras* in den Mäusen mutiert vorlag. Darüber hinaus wurde diese Zelllinie bereits zuvor viral transduziert, um Zellen mit unterschiedlichen *HTRA1* Proteinleveln zu erhalten (Herstellung und Charakterisierung dieser Zelllinien sind beschrieben in Schmidt *et al.*, 2016 sowie Dissertation N. Schmidt). Aus dieser viralen Transduktion entstanden stabile SW480 Zelllinien mit erhöhter *HTRA1* Expression (*pHTRA1*) oder verringerter *HTRA1* Menge durch eine *small hairpin RNA* (shRNA) gegen die *HTRA1* mRNA (*shHTRA1*), sowie zwei Zelllinien, die die korrespondierenden Leervektoren exprimierten (*pLV*, *shLV*). Die *HTRA1* Level der vier Zelllinien wurden zu Beginn dieser Arbeit auf RNA-

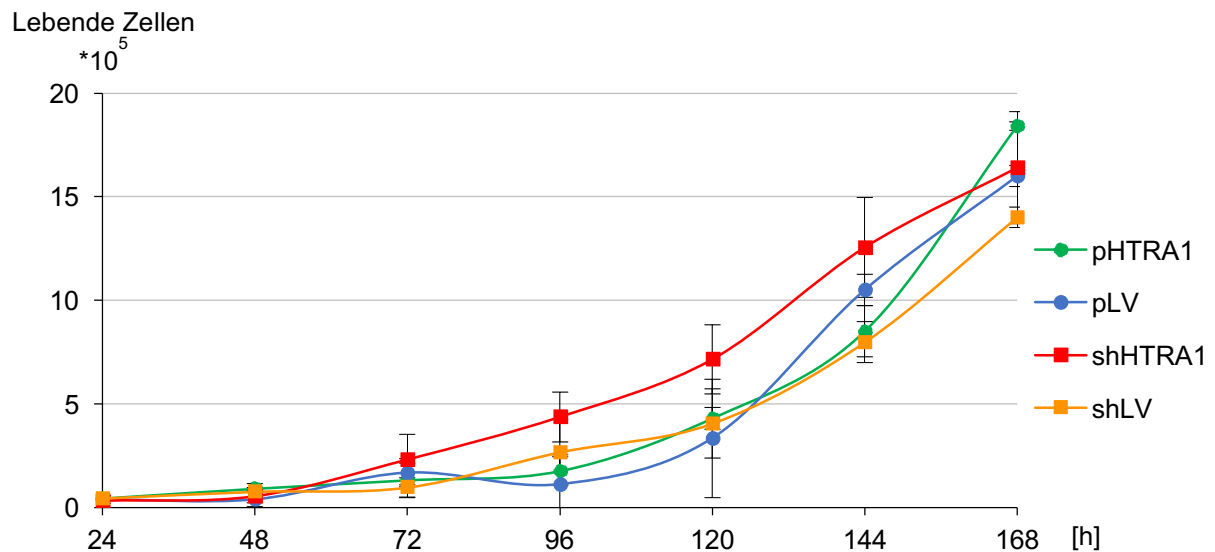


**Abb. 3.2 HTRA1 Level in unterschiedlichen SW480 Zelllinien**

Gemessen wurden Zellen mit *HTRA1* Überexpression (*pHTRA1*), Expression einer shRNA gegen *HTRA1* (*shHTRA1*), Expression der korrespondierenden Leervektoren (*pLV*, *shLV*) und ohne virale Transduktion (Par). **A**) Mittlere normalisierte Expression (MNE) von *HTRA1* in SW480 Zellen gemessen mittels qRT-PCR (2.2.12).  $n = 3$  unabhängige Experimente, je in Triplikaten, mit Standardabweichung. Die Expression von *HTRA1* in *shHTRA1* und *pHTRA1* Zellen war signifikant unterschiedlich von den Leervektor-Zelllinien (Mann-Whitney-U-Test,  $p$ -value < 0,0001). **B**) Western Blot-Analyse mit Immundetektion (2.4.8) von extrazellulärem *HTRA1* aus SW480 Zellkulturüberständen nach einem Serumentzug für 120 h.

und Proteinebene mittels quantitativer *Realtime*-PCR (qRT-PCR, 2.2.12) und Western Blot-Analyse (2.4.8) überprüft und mit den Leveln nicht transduzierter Zellen (parental, par) verglichen (Abb. 3.2). Die qRT-PCR zeigte eine vergleichbare mittlere normalisierte Expression (MNE) von *HTRA1* in par (0,005), pLV (0,005) und shLV Zellen (0,004) (Abb. 3.2A). Im Gegensatz dazu zeigten p*HTRA1* Zellen eine signifikant erhöhte (1,73), sh*HTRA1* Zellen eine signifikant verringerte MNE von *HTRA1* (0,0008) (Mann-Whitney-U-Test, *p-value* < 0,0001). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in der Western Blot-Analyse wieder (Abb. 3.2B). Da die endogenen HTRA1 Level von SW480 Zellen sehr gering sind und ein großer Teil des exprimierten HTRA1 in den extrazellulären Raum sekretiert wird, wurden für die Western Blot-Analyse der HTRA1 Proteinlevel Zellkulturüberstände verwendet (2.3.5). Bei Analyse der Zellkulturüberstände mit einem Antikörper gegen die Kazal-ähnliche Domäne von HTRA1 (Tab. 2.9) wurde in den Überständen der p*HTRA1* Zellen deutlich mehr HTRA1 detektiert als in den Überständen der Kontrollzelllinien. Durch den verwendeten Antikörper wurden zwei Banden bei ca. 50 kDa und 37 kDa erkannt. Bei der kleineren Bande könnte es sich um eine C-terminal verkürzte Form von HTRA1 handeln. In den Überständen der sh*HTRA1* Zellen konnte hingegen kein HTRA1 detektiert werden. Eine korrekte Ladung der Proben wurde vor der Immundetektion mit Ponceau S überprüft (Daten nicht gezeigt).

Um die vier verwendeten Zelllinien weiter zu charakterisieren, wurden mit Hilfe eines automatisierten Zellzählers (Countess II FL) Wachstumskurven erstellt (2.3.4). Hierzu wurden über 168 h alle 24 h jene Zellen gezählt, die bei Färbung mit Trypanblau negativ waren (= lebende Zellen) (Abb. 3.3). Dabei wiesen sh*HTRA1* Zellen ein erhöhtes Wachstum gegenüber den anderen Zelllinien auf. Die Unterschiede waren bei der Messung nach 120 h am größten. Zu diesem Zeitpunkt wurden bei den sh*HTRA1* Zellen durchschnittlich  $7,2 \cdot 10^5$  Zellen, bei den anderen Zelllinien zwischen  $3,3 - 4,3 \cdot 10^5$  Zellen gezählt. Dieser Unterschied wurde mit zunehmender Konfluenz der Kulturen kleiner. Grund dafür ist vermutlich die sogenannte Kontaktinhibition, bei der durch zunehmende Zell-Zell-Kontakte die Stimulation der Zellen durch Wachstumsfaktoren und andere Proliferationssignale blockiert wird (Nelson und Daniel 2002).



**Abb. 3.3 Wachstumskurven von SW480 Zellen**

Wachstumskurven von SW480 Zellen (2.3.4). Über 168 h wurde das Wachstum der Zellen alle 24 h mit Hilfe eines automatisierten Zellzählers (Countess II FL, Lifetechnologies) gemessen. Dabei wurden nur lebende Zellen (= Trypanblau negativ) gezählt. n = 3 unabhängige Experimente, gemessen je in Triplikaten, mit Standardabweichung.

### 3.3. Analyse der Interaktion von HTRA1 mit dem ERK-Signalweg

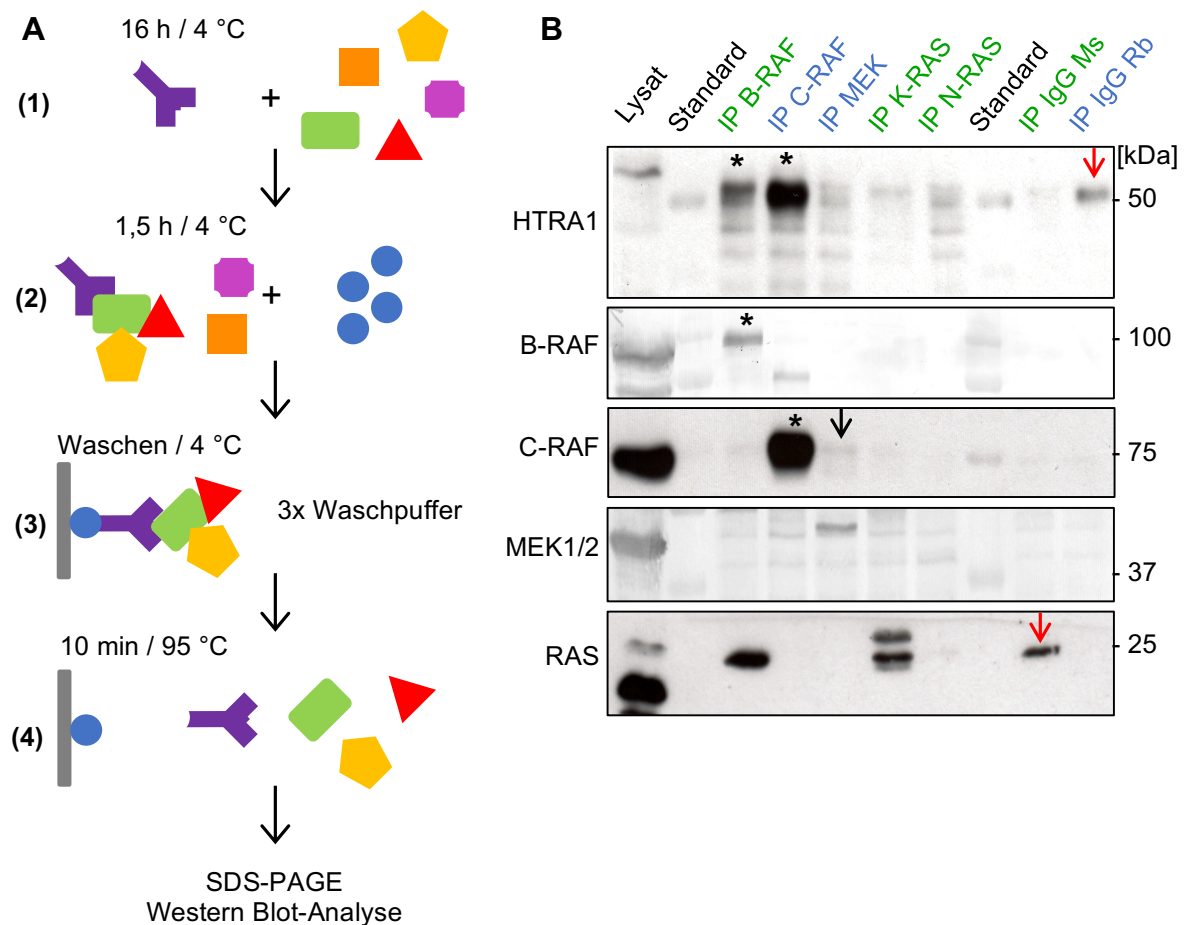
Die experimentellen Daten der beschriebenen *in vivo* Studie (3.1), legen eine Verbindung von Htra1 zu K-ras vermittelten Signalwegen nahe. In einem PDZ-optimierten Peptidscreen in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin<sup>5</sup> wurden darüber hinaus die C-Termini von B-RAF und C-RAF unter den ersten 500 potenziellen HTRA1 Liganden identifiziert (Boisguerin *et al.*, 2004, Boisguerin *et al.*, 2007). Die Ergebnisse deuten auf eine mögliche Interaktion von HTRA1 mit dem ERK-Signalweg hin. Diese sollte im Folgenden näher untersucht werden.

#### 3.3.1. Die Interaktion von HTRA1 und C-RAF in SW480 Zelllysaten

Um eine mögliche Interaktion von HTRA1 mit den Proteinen des ERK-Signalweges zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzipitationen (IPs) und *Pulldown* (PD) Experimente mit SW480 Zelllysaten durchgeführt (2.4.9, 2.4.10). Die experimentellen Abläufe sind schematisch in Abb. 3.4 und Abb. 3.5 dargestellt.

<sup>5</sup> Der Peptidscreen wurde von Prisca Boisguerin und Rudolf Volkmer (Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland) durchgeführt.





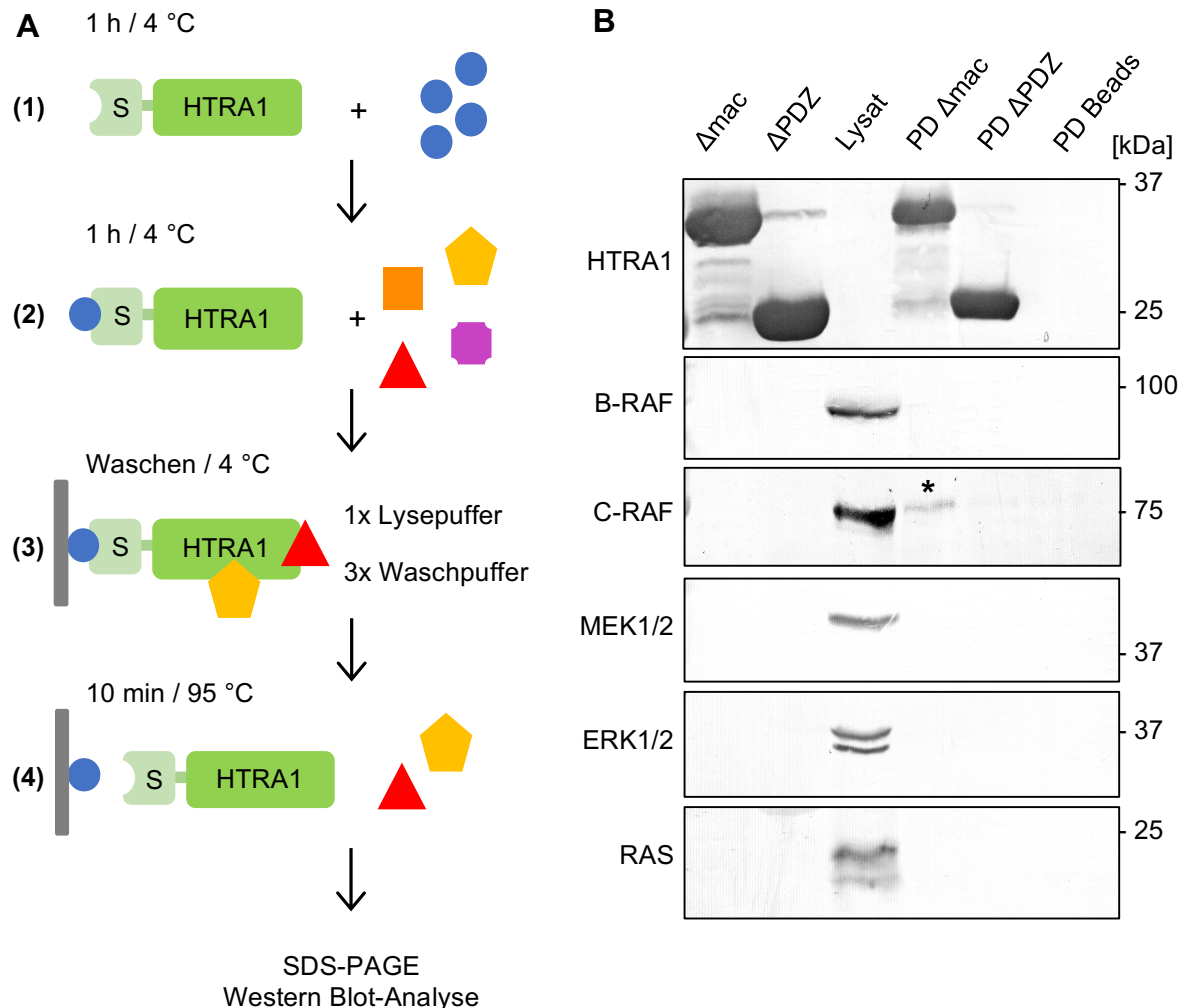
**Abb. 3.4 Co-Immunpräzipitation (IP) von HTRA1 und den Proteinen des ERK-Signalweges aus SW480 Zelllysaten**

**A)** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs von IPs (2.4.9). **(1)** Für die IP wurde der Antikörper gegen das zu untersuchende Protein (lila) ÜN bei 4 °C mit dem Zelllysate von pHTRA1 Zellen inkubiert. **(2)** Anschließend wurden magnetische Protein G-Beads (blau) für 1,5 h zu dem Lysat gegeben. **(3)** Die magnetischen Protein G-Beads mitsamt gebundenen Antikörpern und Proteinen wurden über einen *magnetic particle concentrator* (grau) im Reaktionsgefäß gehalten. Ungebundene Proteine wurden in drei Waschschritten entfernt. **(4)** Durch Erhitzen der Proben in SDS-Puffer für 10 min bei 95 °C wurden die Bindungen zwischen Beads, Antikörpern und Proteinen gelöst. Isolierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse immundetektirt (2.4.8). **B)** Ergebnisse von IPs mit Antikörpern gegen B-RAF, C-RAF, MEK, K-RAS oder N-RAS aus pHTRA1 Zelllysaten. Isotyp-Kontrollen aus Maus (IP IgG Ms) und Kaninchen (IP IgG Rb) wurden mit dem gleichen Zelllysate inkubiert. Die Zugehörigkeit von Antikörpern und Kontrollen ist durch ein Farbschema gekennzeichnet. Mit den Antikörpern gegen B-RAF (IP B-RAF) und C-RAF (IP C-RAF) konnten sowohl B-RAF bzw. C-RAF als auch HTRA1 isoliert werden (Sterne). Mit allen anderen Antikörpern konnten die jeweiligen Zielproteine, nicht jedoch HTRA1 isoliert werden. Mit dem Antikörper gegen MEK1/2 (IP MEK) wurde außerdem C-RAF angereichert (schwarzer Pfeil). Ein Proteinstandard (Standard) diente zur Größenbestimmung der identifizierten Proteine. Die Western Blot-Analysen gegen HTRA1, C-RAF und RAS wurden mittels Meerrettichperoxidase (HRP) visualisiert, B-RAF und MEK1/2 mittels Alkaliner Phosphatase (AP). n = 4 unabhängige Experimente.

Für die IPs wurden *pHTRA1* Zellen aufgeschlossen, die Zelltrümmer entfernt und die gewonnenen Lysate mit je einem Antikörper gegen B-RAF, C-RAF, MEK1/2, K-RAS oder N-RAS inkubiert. Anschließend wurden magnetische Protein G-*Beads* zu den Lysaten gegeben, die an die konstante Region von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) binden. Mit Hilfe eines *magnetic particle concentrator* wurden die *Beads* mit gebundenen Proteinen im Reaktionsgefäß gehalten, während ungebundene Proteine in drei Waschschritten entfernt wurden. Durch Erhitzen der Proben in SDS-Puffer bei 95 °C wurden die Bindungen zwischen *Beads*, Antikörpern und Proteinen gelöst. Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und anschließend in einer Western Blot-Analyse immundetektiert (2.4.8). Um unspezifische Bindungen an die Antikörper zu identifizieren, wurden IgG Isotyp-Kontrollen aus Maus und Kaninchen mit dem gleichen Zelllysate inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass HTRA1 in den IPs von B-RAF und auch C-RAF im Vergleich zu den Isotyp-Kontrollen angereichert werden konnte (Abb. 3.4B). In allen anderen IPs konnten die jeweiligen Zielproteine, jedoch nicht HTRA1 im Vergleich zu den Isotyp-Kontrollen angereichert werden. Zusätzlich wurde in der IP von MEK auch C-RAF angereichert (schwarzer Pfeil). Da C-RAF und MEK1/2 im Rahmen des ERK-Signalweges interagieren (1.5), war dieses Ergebnis ein Hinweis auf die korrekte Durchführung der Experimente. Jene Banden, die in den Isotypkontrollen identifiziert werden konnten, entsprachen vermutlich den schweren (ca. 50 kDa) und leichten Ketten (ca. 23 kDa) der Antikörper, die für die IP verwendet wurden (roter Pfeil).

Als zweite Methode für eine Analyse der Interaktion von HTRA1 und dem ERK-Signalweg wurden PD Experimente durchgeführt. Dazu wurde inaktives rekombinantes HTRA1(S328A) verwendet, das N-terminal an einen doppelten Strep-Tag fusioniert war. Das verwendete HTRA1 Konstrukt enthielt keine N-terminale sogenannte Mac-Domäne ( $\Delta$ mac). Außerdem wurde eine weitere HTRA1 Variante gewählt, der zusätzlich auch die PDZ-Domäne fehlte ( $\Delta$ PDZ) (Abb. 1.1). Die rekombinanten Proteine wurden über den Strep-Tag an magnetische Streptactin-*Beads* immobilisiert. pLV Zellen wurden aufgeschlossen, Zelltrümmer entfernt und die isolierten Zelllysate zum immobilisierten HTRA1 gegeben. Über einen *magnetic particle concentrator* wurden die immobilisierten Proteine über vier Waschschrritte im Reaktionsgefäß gehalten. Anschließendes Erhitzen der Proben in SDS-Puffer für bei 95 °C löste die Bindungen zwischen *Beads* und Proteinen. Die isolierten Proteine

wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und in einer anschließenden Western Blot-Analyse mit Immundetektion (2.4.8) identifiziert.



**Abb. 3.5 Pull-down (PD) der Proteine des ERK-Signalweges mit rekombinantem HTRA1 aus SW480 Zelllysaten**

**A)** Schematische Darstellung der PD Experimente (2.4.10) **(1)** Für die PD Experimente wurde inaktives rekombinantes HTRA1 (grün) mit doppeltem Strep-Tag (S) mit magnetischen Streptactin-Beads inkubiert (blau). **(2)** Anschließend wurde Zelllysate von pLV Zellen zu dem rekombinanten HTRA1 gegeben. **(3)** Die magnetischen Streptactin-Beads sowie gebundene Proteine wurden über einen *magnetic particle concentrator* (grau) im Reaktionsgefäß gehalten. Ungebundene Proteine wurden in vier Waschschritten entfernt. **(4)** Durch Erhitzen der Proben in SDS-Puffer bei 95 °C wurden die Bindungen zwischen Beads und Proteinen gelöst. Isolierte Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und Western Blot-Analyse immundetektiert (2.4.8). **B)** Ergebnisse von PD Experimenten mit rekombinantem HTRA1 mit (Δmac) und ohne PDZ Domäne (ΔPDZ). Zur Kontrolle wurden die rekombinanten Proteine allein aufgetragen. Mit rekombinantem HTRA1 (PD Δmac) konnte C-Raf isoliert werden (Stern). Durch rekombinantes HTRA1 ohne PDZ Domäne (PD ΔPDZ) konnte C-Raf nicht isoliert werden. Alle anderen Proteine konnten im Zelllysate aber in keinem PD detektiert werden. Als Kontrolle wurden die Streptactin Beads alleine mit dem gleichen Zelllysate inkubiert (PD Beads). n = 3 unabhängige Experimente.

Um unspezifische Bindungen an die *Beads* auszuschließen, wurden die Streptactin-*Beads* alleine mit dem gleichen Zelllysats inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass im PD mit HTRA1 $\Delta$ mac C-RAF isoliert werden konnte (Abb. 3.5B). Im PD mit HTRA1 $\Delta$ PDZ konnte C-RAF nicht detektiert werden. Alle anderen ERK-Signalweg Proteine (RAS, B-RAF, MEK1/2, ERK1/2) konnten zwar im Zelllysats aber in keinem PD detektiert werden. Die *Bead* Kontrolle war für alle Immundetektionen negativ. Diese Ergebnisse stimmten mit den Daten einer massenspektrometrischen Analyse von PDs aus HeLa-Zellen überein (persönliche Kommunikation K. Severin). Insgesamt zeigen die experimentellen Daten aus IPs und PD Experimenten, dass HTRA1 in SW480 Zelllysaten mit C-RAF interagiert. Die PD Experimente legen den Schluss nahe, dass diese Interaktion über die PDZ Domäne vermittelt wird.

### 3.3.2. Die Interaktion von HTRA1 und C-RAF *in vitro*<sup>6</sup>

In IPs und PD Experimenten mit SW480 Zelllysaten konnte eine Interaktion von HTRA1 und C-RAF gezeigt werden. Um die Art der Interaktion näher zu charakterisieren, wurden weitere *in vitro* Experimente durchgeführt. Es sollte zunächst untersucht werden, ob HTRA1 und C-RAF *in vitro* einen Komplex ausbilden. Dazu wurden die proteolytisch inaktive Form (S328A) von HTRA1 $\Delta$ mac (37 kDa) rekombinant gereinigt (2.4.2). Da eine Reinigung des gesamten C-RAF Proteins aus *E. coli* nicht möglich war, wurde die RAS-Bindedomäne (RBD) von C-RAF (9,6 kDa), die essentiell für die Interaktion von RAS und RAF und somit für die RAF Aktivierung ist (Marais *et al.*, 1995), an einen GST-Tag fusioniert und ebenfalls rekombinant gereinigt. Der Tag wurde im Verlauf der Reinigung mit Hilfe von Thrombin proteolytisch entfernt.

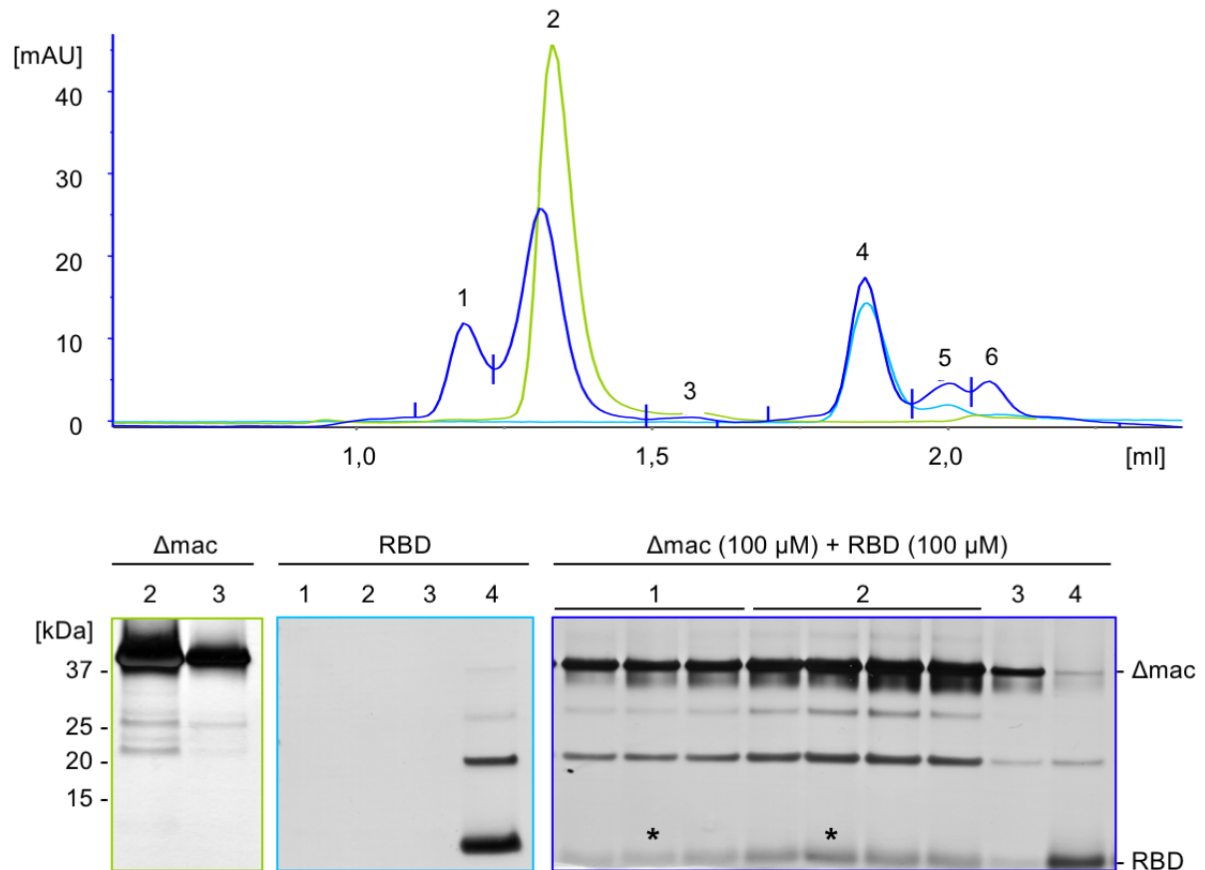
Um die Bildung eines HTRA1-C-RAF Komplexes zu analysieren, wurde die Methode der Größenausschlusschromatographie (SEC) gewählt (2.4.13). Hierfür wurden HTRA1 $\Delta$ mac und die C-RAF-RBD jeweils alleine (je 100  $\mu$ M) oder gemeinsam in einem Verhältnis von 1:5 (50  $\mu$ M:250  $\mu$ M) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine an einer FPLC Anlage vom Typ ÄKTAmicro (GE Healthcare) mittels SEC der Größe nach aufgetrennt (Abb. 3.6). Fraktionen der gemessenen

---

<sup>6</sup> Dieser Teil der Arbeit wurde in Kooperation mit Juliana Rey (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland) durchgeführt.

Peaks wurden dann mittels SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Silberfärbung (2.4.7) analysiert. Durch eine Kalibrierung der verwendeten Chromatographiesäule (Superdex 200 3.2/300) mit einem Proteinstandard im gleichen Puffer (Tab. 2.14), konnten die Größen der eluierten Proteine ungefähr berechnet werden. HTRA1 $\Delta$ mac alleine (grün) zeigte einen großen Peak mit einem Elutionsvolumen von 1,33 ml (Peak 2) und einen kleinen Peak bei 1,58 ml (Peak 3). Dies entsprach einer Masse von ca. 136,5 und 40,9 kDa und somit vermutlich dem HTRA1 $\Delta$ mac Trimer bzw. Monomer (theoretische Größen 111 bzw. 37 kDa). Das Chromatogramm der RBD alleine (türkis) zeigte einen Peak bei 1,88 ml (Peak 4), was einer Masse von ca. 9,7 kDa entsprach und einen kleineren Peak bei 2,07 ml (ca. 3,9 kDa), der wegen der geringen Werte vernachlässigt wurde. Nach Analyse mittels SDS-PAGE und Silberfärbung war für die RBD zusätzlich zu der Bande bei ca. 10 kDa eine weitere Bande bei einer Größe von ca. 20 kDa erkennbar. Diese war nach Coomassie-Färbung nicht zu erkennen (Abb. 3.7) und somit vermutlich nur in geringer Menge vorhanden. Da die Coomassie-Färbung im Gegensatz zur Silberfärbung eine quantitative Aussage über die detektierten Proteine erlaubt, können die einzelnen Banden deshalb miteinander verglichen werden. Da für die RBD keine Antikörper erhältlich waren, konnte diese Bande nicht genauer definiert werden.

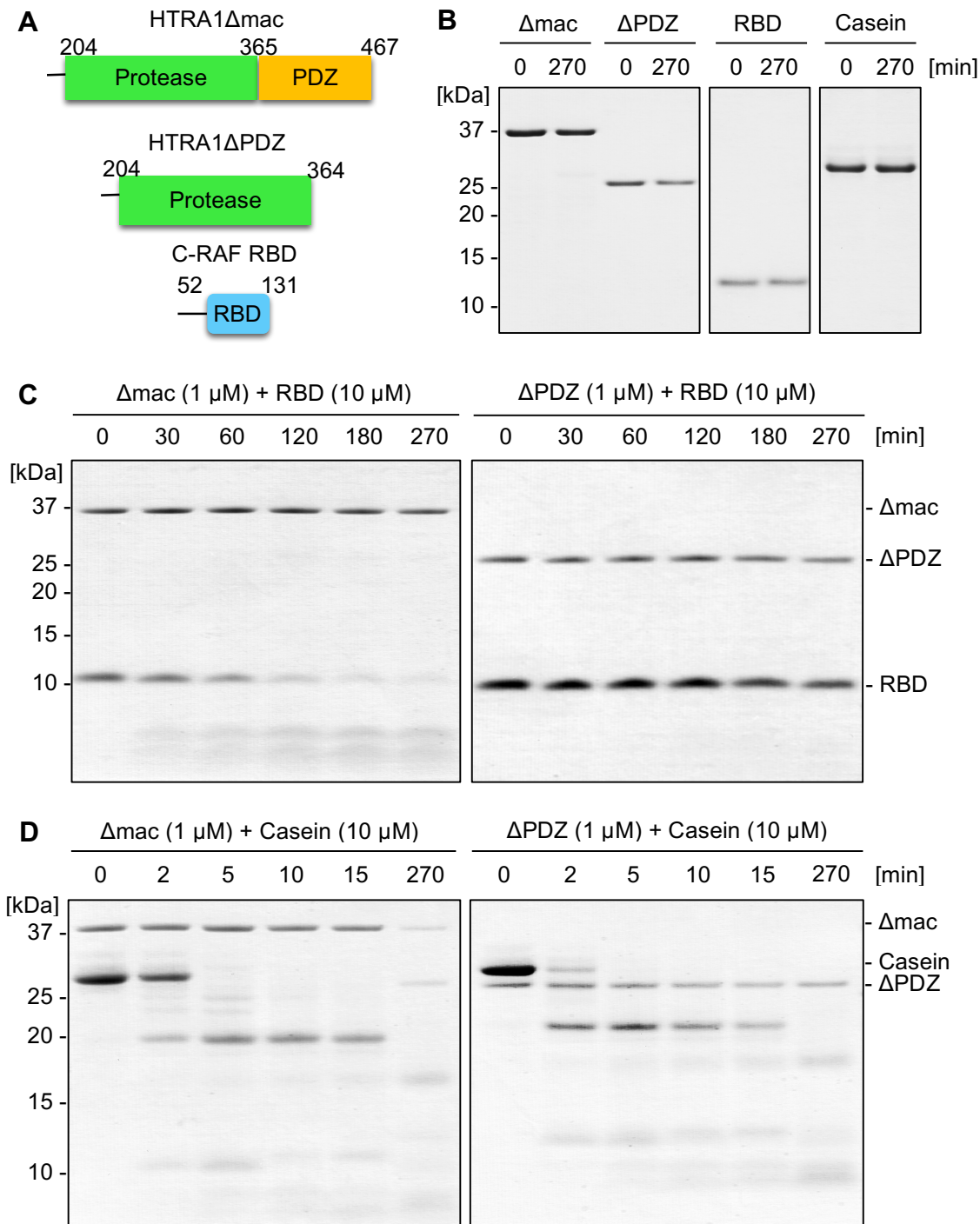
Nur nach einer gemeinsamen Vorinkubation von HTRA1 $\Delta$ mac und RBD (blau) konnte die RBD auch in den Fraktionen aus Peak 2 und 3 detektiert werden (Stern), was auf die Bildung eines heterooligomeren Komplexes hindeutete. Die Maxima dieser Peaks verschoben sich durch Bindung der RBD leicht zu kleineren Elutionsvolumina und damit höherem Molekulargewicht. Peak 2 verschob sich von 1,33 zu 1,31 ml (136,5 zu 150,3 kDa) und Peak 3 von 1,58 zu 1,57 ml (40,9 zu 43,0 kDa). Darüber hinaus konnte ein weiterer Peak (Peak 1) detektiert werden, der in den beiden Einzelanalysen nicht zu beobachten war. Das Elutionsvolumen dieses Peaks betrug 1,18 ml und entsprach einer Größe von ca. 281,1 kDa. In den Fraktionen dieses Peaks wurden beide Proteine identifiziert. Da die Silberfärbung von Proteinen nicht quantitativ ist, konnte aus den beobachteten Ergebnissen keine Stöchiometrie des Komplexes bestimmt werden.



**Abb. 3.6 Analyse eines Komplexes aus HTRA1 $\Delta$ mac und der C-RAF-RBD**

Gezeigt ist das Chromatogramm der Analyse von HTRA1 $\Delta$ mac(S328A) und RBD mittels Größenausschlusschromatographie (2.4.13) und anschließender Detektion mittels SDS-PAGE (2.4.5) und Silberfärbung (2.4.7). Als Kontrollen wurden HTRA1 $\Delta$ mac alleine (100  $\mu$ M, grün) oder die RBD alleine (100  $\mu$ M, türkis) analysiert. HTRA1 konnte bei den Elutionsvolumina 1,33 (Peak 2) und 1,58 ml (Peak 3), die RBD bei 1,88 ml (Peak 4) detektiert werden. Nach einer gemeinsamen Vorinkubation der Proteine im Verhältnis 1:5 (50  $\mu$ M:250  $\mu$ M) für 10 min bei 37 °C wurde die RBD auch in Peak 2 und 3 detektiert, die sich dabei zu 1,31 und 1,57 ml verschoben. Zusätzlich wurde ein neuer Peak bei 1,18 ml (Peak 1) detektiert, dessen Fraktionen beide Proteine enthielten. n = 3 unabhängige Experimente.

Nachdem die Bildung eines Komplexes aus HTRA1 und der C-RAF-RBD *in vitro* beobachtet werden konnte, sollte in einem zweiten Schritt analysiert werden, ob die C-RAF-RBD ein *in vitro* Substrat von HTRA1 ist. Dazu wurden erneut rekombinante Proteine verwendet: Die proteolytisch aktive Form von HTRA1 $\Delta$ mac (37 kDa) und HTRA1 $\Delta$ PDZ (25 kDa), sowie die C-RAF-RBD (9,6 kDa) (Abb. 3.7A). Als Kontrolle wurde  $\beta$ -Casein (24 kDa) als bekanntes *in vitro* Substrat von HTRA1 verwendet. Die Proteine wurden alleine oder gemeinsam bei 37 °C für 270 min inkubiert. Nach 0, 30, 60, 120, 180 und 270 min wurden Proben für die Analyse mittels SDS-PAGE (2.4.5) entnommen. Die resultierenden SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie-



**Abb. 3.7 Proteolyse der C-RAF-RBD durch rekombinantes HTRA1**

Proteolyse der C-RAF-RBD (9,6 kDa) und  $\beta$ -Casein (24 kDa) durch HTRA1 $\Delta$ mac (37 kDa) und HTRA1 $\Delta$ PDZ (25 kDa) (2.4.11). Dargestellt sind die verwendeten Proteinvarianten (**A**) und die Ergebnisse der Proteolyse (**B-D**), die mittels SDS-PAGE (2.4.5) und anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) visualisiert wurden. Die Zeitpunkte der Probenentnahme sind in min angegeben.  $n = 5$  unabhängige Experimente. **A**) Schematische Darstellung von HTRA1 $\Delta$ mac ( $\Delta$ mac) bestehend aus Protease-Domäne (grün) und PDZ-Domäne (orange), HTRA1 $\Delta$ PDZ ( $\Delta$ PDZ) bestehend nur aus der Protease-Domäne (grün), sowie der RBD von C-RAF (blau). Die entsprechenden Nummern der Aminosäuren innerhalb der originalen Proteinsequenz sind angegeben. **B**) Als Kontrolle wurden alle Proteine allein unter den Reaktionsbedingungen der Proteolyse inkubiert. **C**) Proteolyse der RBD durch  $\Delta$ mac und  $\Delta$ PDZ. **D**) Proteolyse von  $\beta$ -Casein durch  $\Delta$ mac und  $\Delta$ PDZ.

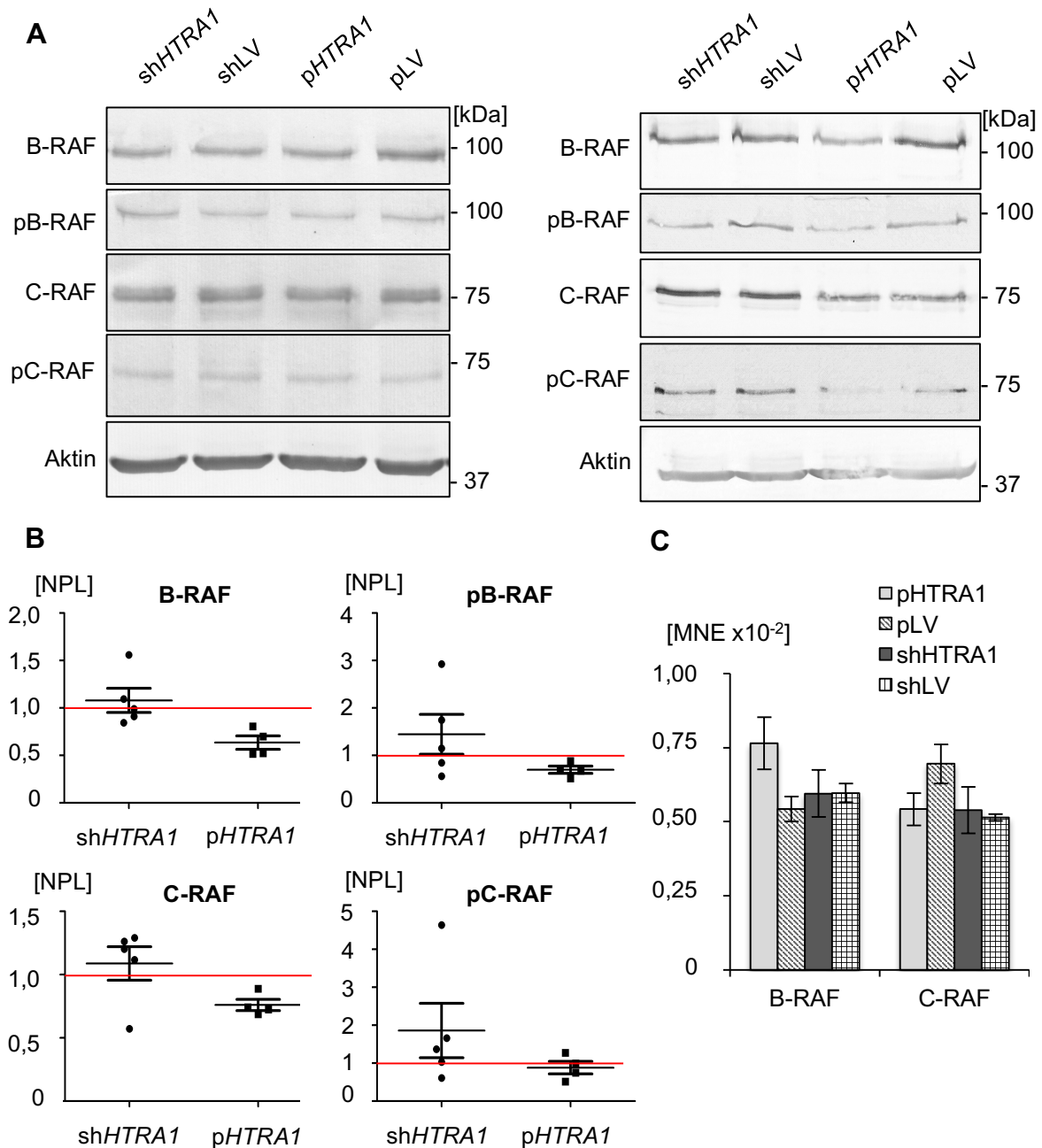
Brillant-Blau gefärbt (2.4.6). Alle Proteine waren über 270 min unter den beschriebenen Bedingungen stabil (Abb. 3.7B). Für die Proteolyse wurden Protease und Substrat im Verhältnis 1:10 (1  $\mu$ M:10  $\mu$ M) eingesetzt (Abb. 3.7C). Für HTRA1 $\Delta$ mac war ein Abbau der RBD bereits nach 30 min zu beobachten. Dabei entstanden zwei kleinere Banden, die Abbauprodukten der C-RAF-RBD entsprachen. Nach 270 min waren fast nur noch Abbauprodukte und keine C-RAF-RBD-Bande mehr zu erkennen. Für HTRA1 $\Delta$ PDZ war unter diesen Bedingungen kein Abbau der C-RAF-RBD zu detektieren. Die Bande, die der C-RAF-RBD entsprach, blieb über 270 min stabil und es entstanden keine Abbauprodukte. Um sicherzustellen, dass beide HTRA1 Varianten ähnlich aktiv waren, wurden diese unter den gleichen Bedingungen mit  $\beta$ -Casein inkubiert (Abb. 3.7D). Bei beiden Proteasen war  $\beta$ -Casein bereits nach 5 min vollständig proteolysiert. Die zunehmende Anzahl an Banden im Verlauf der Proteolyse entsprach Abbauprodukten von  $\beta$ -Casein. HTRA1 $\Delta$ PDZ zeigte in dieser Proteolyse nach 2 min eine etwas höhere Aktivität als HTRA1 $\Delta$ mac. Für HTRA1 $\Delta$ mac war nach 270 min ein geringes Maß an Autoproteolyse zu erkennen.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass HTRA1 und die C-RAF RBD *in vitro* interagieren und die RBD ein *in vitro* Substrat von HTRA1 ist. Die Proteolyse der RBD war, bei ähnlicher Aktivität der verwendeten HTRA1 Varianten, abhängig von Anwesenheit der PDZ-Domäne.

### 3.3.3. Der Einfluss von HTRA1 auf die RAF Level in SW480 Zellen

Nachdem eine Interaktion von HTRA1 mit C-RAF *in vitro* (3.3.2) und in SW480 Zelllysaten (3.3.1) gezeigt und die C-RAF-RBD als ein *in vitro* Substrat von HTRA1 identifiziert werden konnte (3.3.3), wurden weitere Zellkultur-basierte Analysen durchgeführt, um zu untersuchen ob die Raf Proteine auch mögliche *in vivo* Substrate von HTRA1 sind. Die Proteinlevel von B-RAF und C-RAF wurden deshalb mittels Western Blot-Analyse (2.4.8) in den vier SW480 Zelllinien mit unterschiedlichen HTRA1 Leveln verglichen. Dabei wurden auch die phosphorylierten Formen der Proteine analysiert. Da die phosphorylierten Proteine den aktiven Formen entsprechen, diente die Menge an phosphoryliertem RAF als Indikator für die RAF-Aktivität in SW480 Zellen.





**Abb. 3.8 Der Einfluss von HTRA1 auf die Level von B- und C-RAF in SW480 Zellen**

**A)** Ergebnisse aus zwei Western Blot-Analysen von SW480 Zelllysaten (2.4.8) mit anschließender Immundetektion von B- und C-RAF sowie den phosphorylierten Varianten der Proteine (pB- und pC-RAF). Aktin diente als Ladekontrolle. **B)** Ergebnis der Quantifizierung von Western Blot-Analysen aus SW480 Zelllysaten mit dem Programm Fiji ( $n =$  mindestens 4 unabhängige Experimente) nach Normierung auf die Ladekontrolle und die korrespondierende Leervektor-Zelllinie ( $LV = 1$ , rote Linie). Eine statistische Analyse (2.5) ergab keine signifikanten Unterschiede in den normalisierten Protein Levels (NPL) von B- oder C-RAF (Mann-Whitney-U-Test,  $p\text{-value} < 0,05$ ). **C)** Expression von B- und C-RAF in den vier SW480 Zelllinien gemessen mittels qRT-PCR (2.2.12) ( $n = 3$  unabhängige Experimente, je in Triplikaten, mit Standardabweichung). Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Expression B-RAF (Ein-Weg-ANOVA,  $p\text{-value} > 0,05$ ) oder C-RAF (Kruskal-Wallis-Test,  $p\text{-value} > 0,05$ ) in den vier getesteten Zelllinien.

Um die Proteinlevel von B-RAF und C-RAF in SW480 Zellen zu vergleichen, wurden von allen vier Zelllinien Lysate hergestellt (2.3.5). Die Zellen wurden stets bei einer Konfluenz von ca. 80 % geerntet. Die Proteine aus den Zelllysaten wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) der Größe nach aufgetrennt und anschließend in Western Blot-Analysen immundetektiert (2.4.8). Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen fielen sehr unterschiedlich aus. In manchen Experimenten waren keine Unterschiede erkennbar, in anderen Experimenten zeigten *pHTRA1* Zellen verringerte Mengen B-RAF und C-RAF bzw. phosphoryliertes B- und C-RAF (pB-RAF, pC-RAF) (Abb. 3.8A). Um eine quantitative Aussage über die Proteinlevel treffen zu können, wurden die Proteinbanden mit der Software Fiji ausgewertet (Abb. 3.8B). Im Anschluss wurden die gemessenen Werte zunächst auf die Werte der Ladekontrolle (Aktin) und dann auf die Werte der korrespondierenden Leervektorkontrolle normiert (rote Linie), um die Ergebnisse über die Experimente hinweg vergleichen zu können. Auch in dieser Analyse zeigten die berechneten Werte große Abweichungen (Abb. 3.8B). Für C-RAF beispielsweise schwankten die gemessenen Werte in *shHTRA1* Zellen zwischen einer 0,84-fachen und einer 1,56-fachen Proteinmenge verglichen mit den *shLV* Zellen. Tendenziell zeigten *pHTRA1* Zellen geringere Mengen phosphoryliertes und gesamtes RAF im Vergleich zu *shHTRA1* Zellen und den Leervektorkontrollen (Abb. 3.8B). Insgesamt konnten in den Western Blot-Analysen jedoch keine reproduzierbaren, statistisch signifikanten Ergebnisse bezüglich der Proteinmengen erzielt werden (Mann-Whitney-U-Tests,  $p\text{-value} > 0,05$ ).

Neben den Protein-Leveln wurde auch die Expression von *B-RAF* und *C-RAF* in SW480 Zellen mittels qRT-PCR überprüft (2.2.12). Alle Zelllinien wiesen eine vergleichbare Expression der beiden Gene auf (Abb. 3.8C). Die Werte der MNE lagen für alle vier Zelllinien zwischen  $5,4 \cdot 10^{-3}$  und  $7,7 \cdot 10^{-3}$  für *B-RAF* und  $5,4 \cdot 10^{-3}$  und  $7,0 \cdot 10^{-3}$  für *C-RAF*. Eine statistische Analyse der gemessenen Werte aller vier Zelllinien ergab keine signifikanten Unterschiede in der Expression von *B-RAF* (Ein-Weg-ANOVA,  $p\text{-value} > 0,05$ ) oder *C-RAF* (Kruskal-Wallis-Test,  $p\text{-value} > 0,05$ ). Die tendenziell geringere Proteinmenge von B- und C-RAF in *pHTRA1* Zellen konnte also nicht durch Unterschiede in der Expression der Proteine erklärt werden. Ganz im Gegenteil zeigten *pHTRA1* Zellen sogar eine etwas höhere Expression von *B-RAF* (MNE  $7,7 \cdot 10^{-3}$ ) als die drei anderen Zelllinien (MNE  $5,4 - 6,0 \cdot 10^{-3}$ ).

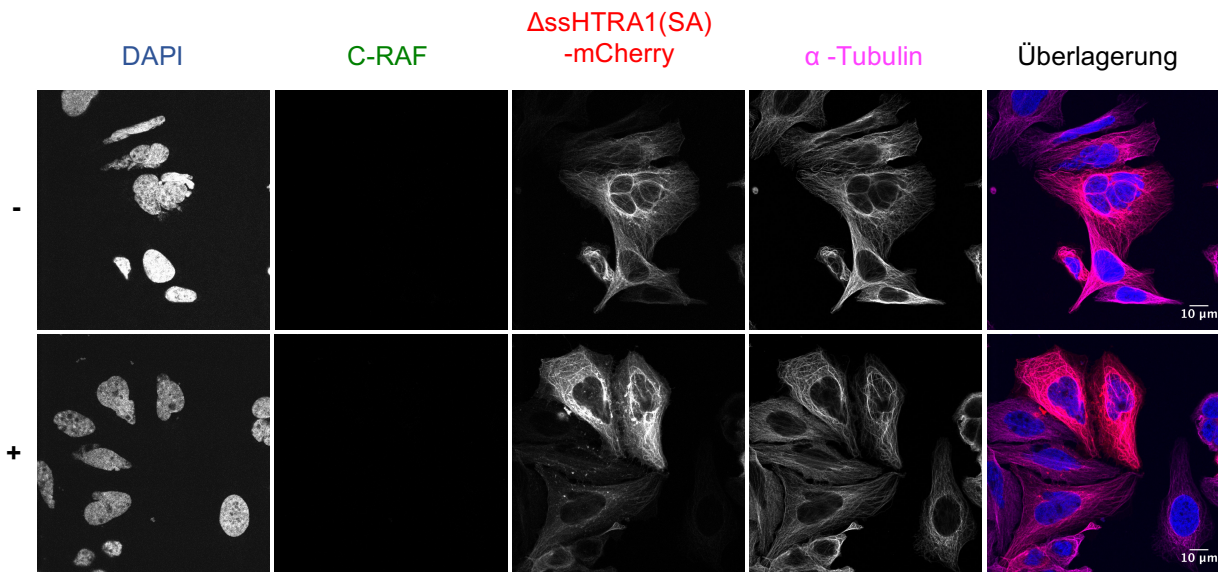
Anhand der experimentellen Daten ließ sich keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob B- oder C-RAF unter den gegebenen Bedingungen potenzielle *in vivo* Substrate von HTRA1 sind.

### 3.3.4. Analyse der zellulären Lokalisation von HTRA1 und C-RAF

Im Anschluss an die Western-Blot Analysen, wurde die Lokalisation von HTRA1 und C-RAF in SW480 Zellen mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) (2.3.11) untersucht. Eine mögliche Kolokalisation sollte Aufschluss darüber geben, ob C-RAF als ein *in vivo* Interaktionspartner von HTRA1 in Frage kommt.

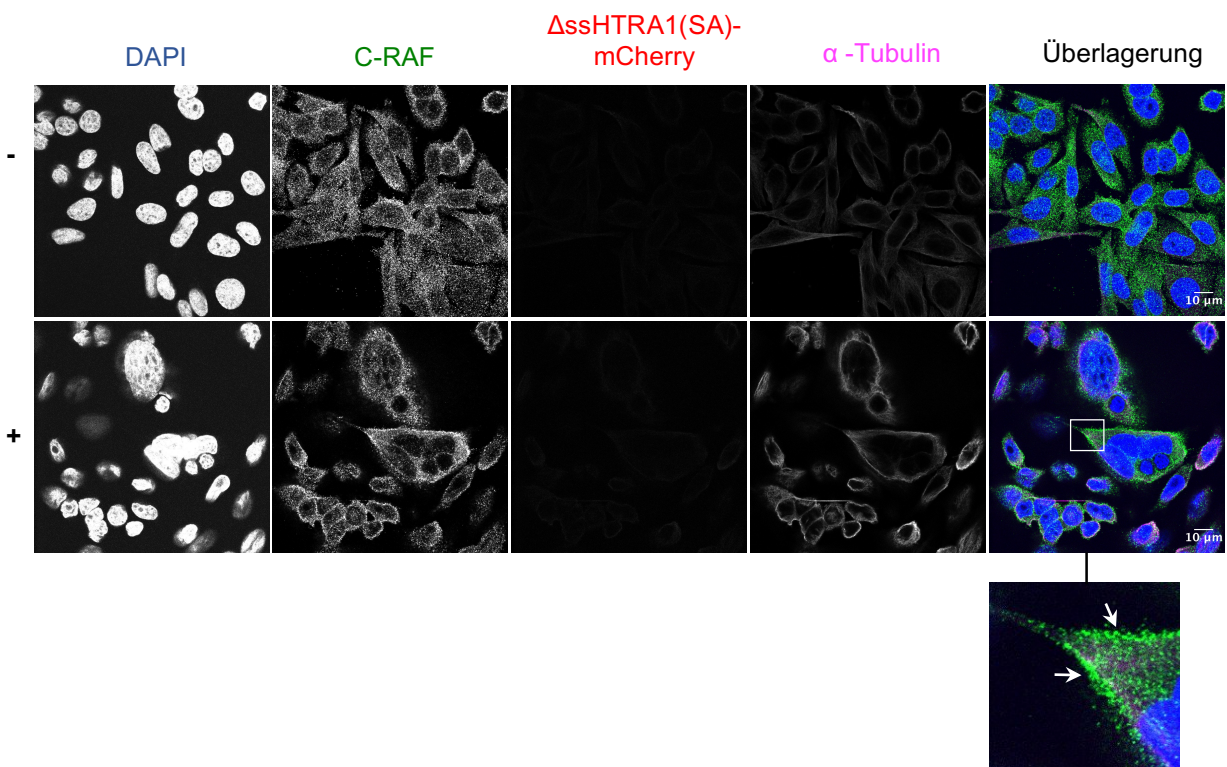
#### *Die Lokalisation von endogenem C-RAF in SW480 Zellen*

Für die Analyse einer möglichen Kolokalisation von HTRA1 und C-RAF, wurden parentale SW480 Zellen mittels *Lipofectamine 2000* transient transfiziert (2.3.10). Verwendet wurden Plasmide für die Expression von inaktivem HTRA1 ohne Signalsequenz, fusioniert an das fluoreszierende Protein mCherry ( $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry) oder mCherry alleine (2.1.4). Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Serum freiem Medium kultiviert. Eine Stimulation der Zellen mit EGF (100 ng/ml in 10 mM Essigsäure) oder der entsprechenden Menge Essigsäure erfolgte 5 min vor Fixierung. Um die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zellen zu untersuchen, wurden C-RAF (Kaninchen, Sekundärantikörper Alexa-488) und  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633) immundetektiert. Außerdem wurde der Zellkern mit dem Farbstoff DAPI gefärbt. Die Aufnahme der Zellen erfolgte am Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop (Leica Microsystems). Alle Kontrollen, die nur mit dem verwendeten Sekundärantikörper gefärbt wurden, waren negativ (Daten nicht gezeigt).  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry zeigte, wie in vorherigen Arbeiten beschrieben (Dissertation Anette Tennstädt), in allen Proben eine tubuläre Struktur (Abb. 3.9). Das Signal für C-RAF war in den analysierten SW480 Zellen im gesamten Zytoplasma, nicht jedoch im Zellkern vorhanden (Abb. 3.10). Das gemessene Signal war über die Zelle verteilt, wies aber punktartige Strukturen auf. Dies kann ein Hinweis für eine geringe Spezifität oder eine schlechte Zugänglichkeit des Epitops des Antikörpers sein. Auch die Verwendung unterschiedlicher Verdünnungen des Antikörpers verbesserte die Färbung nicht (Daten nicht gezeigt). Eine Stimulation mit EGF führte zu einer teilweisen Verlagerung des C-RAF Signals an die Zellmembran (Pfeil).



**Abb. 3.9 Lokalisation von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry in SW480 Zellen**

Gezeigt sind repräsentative CLSM Aufnahmen von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry (rot) transfizierten SW480 Zellen ohne (-) oder mit (+) Stimulation durch EGF (100 ng/ml, 5 min). Für  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633, magenta) wurden eine Immunfärbung durchgeführt. Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI visualisiert (blau). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

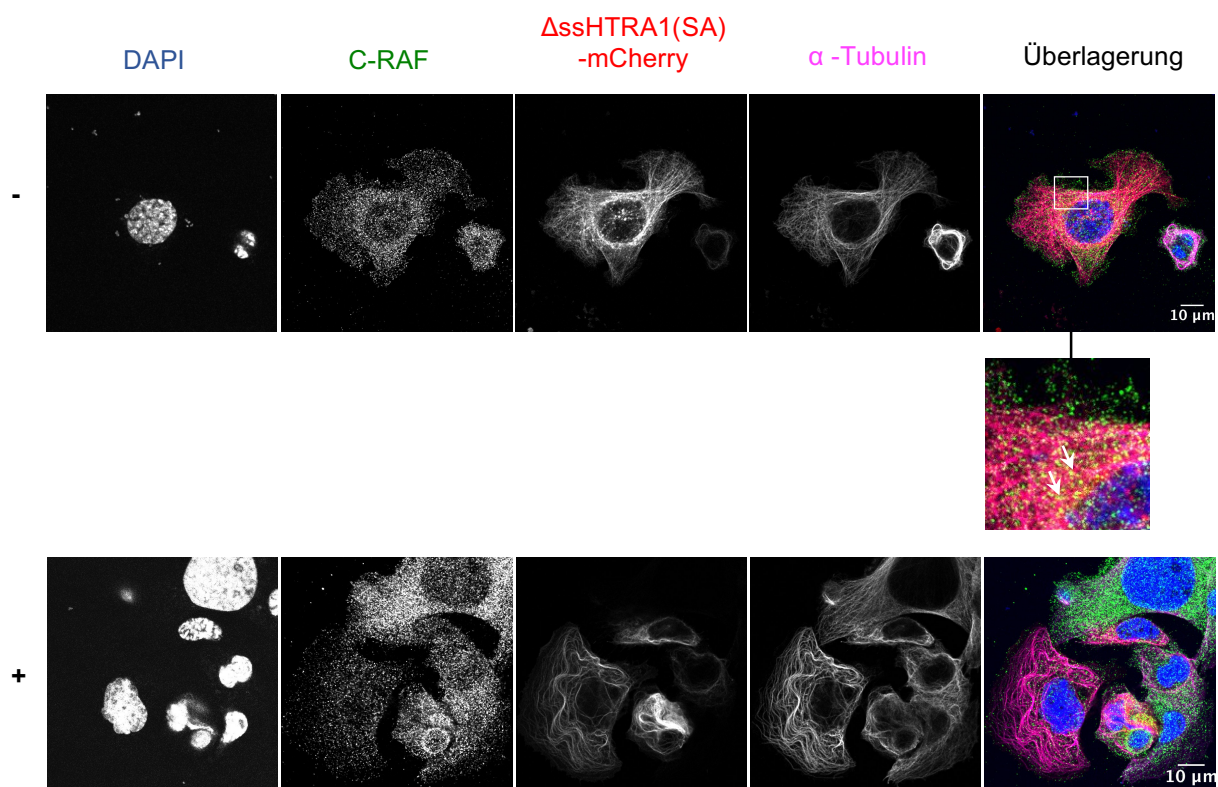


**Abb. 3.10 Lokalisation von endogenem C-RAF in SW480 Zellen**

Gezeigt sind repräsentative CLSM Aufnahmen von nicht transfizierten SW480 Zellen ohne (-) oder mit (+) Stimulation durch EGF (100 ng/ml, 5 min). Für endogenes C-RAF (Kaninchen, Sekundärantikörper Alexa-488, grün) und  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633, magenta) wurden eine Immunfärbung durchgeführt. Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI visualisiert (blau). Nach EGF Stimulation verlagerte sich das C-RAF Signal zur Zellmembran (Pfeil). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Da C-RAF bei Aktivierung von den Ras Proteinen an die Zellmembran rekrutiert wird, sprach dieses Ergebnis wiederum für eine korrekte Färbung von C-RAF. Das gemessene punktförmige Signal könnte also auch die reale Verteilung von C-RAF innerhalb der Zelle darstellen.

Zellen, die nur mCherry exprimierten, zeigten ein diffuses Signal für mCherry in der gesamten Zelle. Eine gleichzeitige Färbung von C-RAF zeigte keine Kolokalisation zwischen den beiden Proteinen (Daten nicht gezeigt). In jenen Proben, die mit  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry transfiziert und gleichzeitig für C-RAF gefärbt wurden, konnte eine Kolokalisation beider Proteine beobachtet werden (Abb. 3.11). Eine Überlagerung der Signale war vor allem am äußeren Rand des HTRA1 Signals zu erkennen (Pfeil). Eine Stimulation der Zellen mit EGF zeigte keinen Effekt auf die Kolokalisation. Eine Verschiebung des C-RAF Signals an die Membran war in diesen Proben nicht zu sehen.



**Abb. 3.11 Kolokalisation von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry und endogenem C-RAF**

Gezeigt sind repräsentative CLSM Aufnahmen von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry (rot) transfizierten SW480 Zellen ohne (-) oder mit (+) Stimulation durch EGF (100 ng/ml, 5 min). Für endogenes C-RAF (Kaninchen, Sekundärantikörper Alexa-488, grün) und  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633, magenta) wurden eine Immunfärbung durchgeführt. Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI visualisiert (blau). Eine Überlagerung beider Signale zeigte sich gelb (Pfeile). Nach EGF Stimulation nahm die Überlagerung der Signale zu.



Ein Grund dafür könnten die großen Mengen des überexprimierten HTRA1 sein. Die Spezifität der beobachteten Koloalisation sollte aufgrund der fraglichen Spezifität des Antikörpers gegen C-RAF und der artifiziellen Überexpression von HTRA1 jedoch kritisch betrachtet werden.

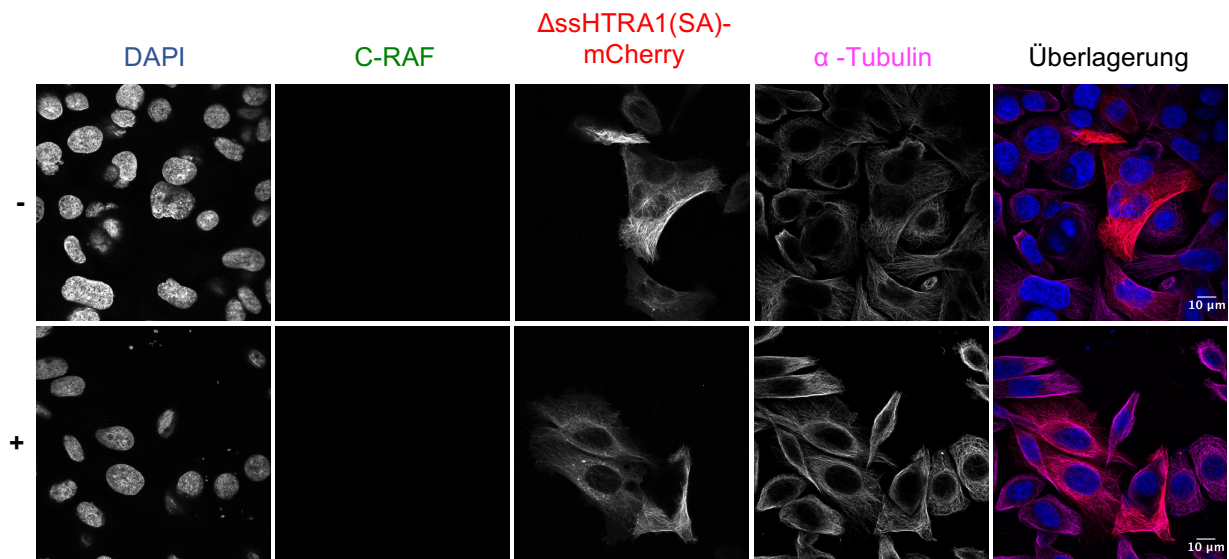
#### *Die Lokalisation von eGFP-CRAF in SW480 Zellen*

Um die zelluläre Lokalisation von C-RAF ohne eine Antikörperfärbung zu untersuchen, wurde die cDNA Sequenz des *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert, der bereits die vollständige cDNA-Sequenz von humanem C-RAF enthielt (Tab. 2.5). Das Fusionsprotein war so konstruiert, dass C-RAF N-terminal über einen vier Aminosäure langen Linker (GRGS) mit eGFP verbunden war. Der C-Terminus von C-RAF wurde zuvor als potentieller HTRA1 Ligand identifiziert (3.3.1). Um eine potentielle Interaktion beider Proteine nicht zu behindern, wurde ein N-terminaler Tag für das Fusionsprotein gewählt. Eine erfolgreiche Expression des Fusionsproteins in SW480 Zellen wurde zunächst mittels Western Blot-Analyse überprüft (Daten nicht gezeigt). Nicht transduzierte SW480 Zellen wurden mittels *Lipofectamine 2000* transient mit Plasmiden für die Expression von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry, eGFP-C-RAF, mCherry oder eGFP transfiziert (2.3.10). Anschließend wurden die Zellen für 24 h in Serum freiem Medium kultiviert. Eine Behandlung der Zellen mit EGF (100 ng/ml in 10 mM Essigsäure) oder der entsprechenden Menge Essigsäure erfolgte 5 min vor Fixierung. Um die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zellen bestimmen zu können, wurde der Zellkern mit dem Farbstoff DAPI und ein Teil des Zytoskeletts mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin (Sekundärantikörper Alexa-633) immundetektiert (2.3.11). Die Aufnahme der Zellen erfolgte erneut am Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop (Leica Microsystems)<sup>7</sup>.

Die Kontrollen, die eGFP oder mCherry allein exprimierten, zeigten ein diffuses Signal der Proteine in der gesamten Zelle. Eine Kombination von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry mit eGFP oder von eGFP-C-RAF mit mCherry zeigte keine Koloalisation (Daten nicht gezeigt).  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry zeigte in allen Proben erneut eine tubuläre Lokalisation. (Abb. 3.12). Das exprimierte eGFP-C-RAF war in den analysierten

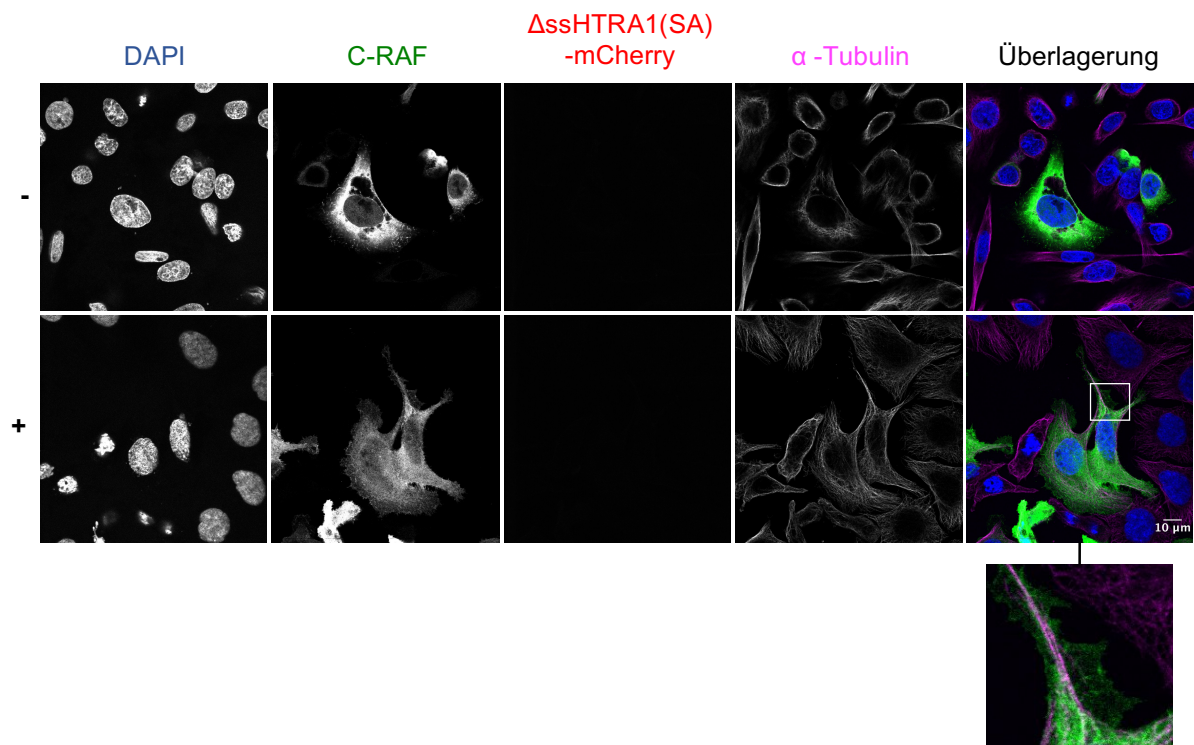
---

<sup>7</sup> Diese Versuchsreihe wurde im Rahmen eines Laborpraktikums gemeinsam mit Laura Pedroza durchgeführt.



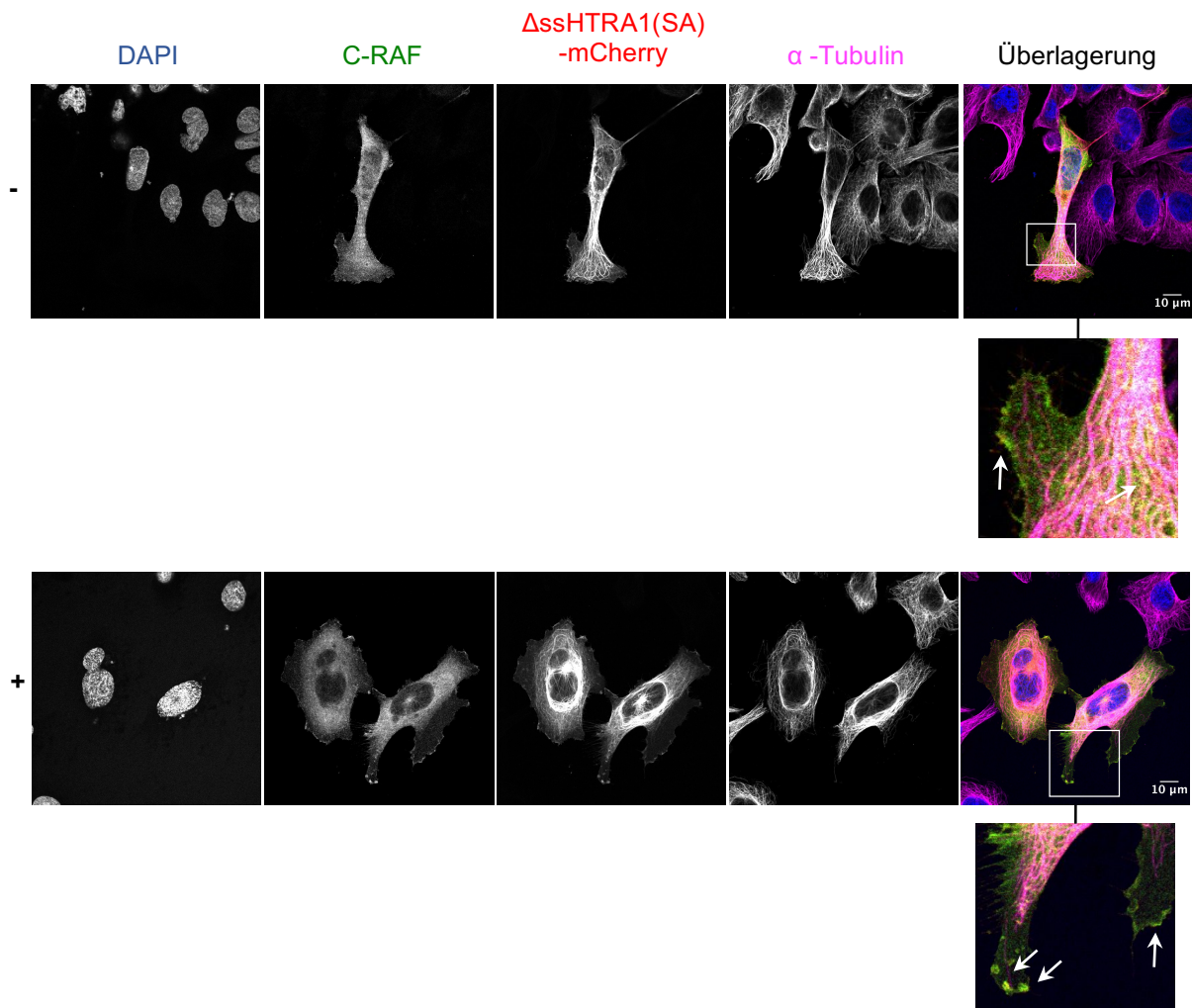
**Abb. 3.12 Lokalisation von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry in SW480 Zellen vor Co-Transfektion**

Gezeigt sind repräsentative CLSM Aufnahmen von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry (rot) transfizierten SW480 Zellen ohne (-) oder mit (+) Stimulation durch EGF (100 ng/ml, 5 min). Für  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633, magenta) wurden eine Immunfärbung durchgeführt. Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI visualisiert (blau). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.



**Abb. 3.13 Lokalisation von eGFP-C-RAF in SW480 Zellen vor Co-Transfektion**

Gezeigt sind repräsentative CLSM Aufnahmen von eGFP-C-RAF (grün) transfizierten SW480 Zellen ohne (-) oder mit (+) Stimulation durch EGF (100 ng/ml, 5 min). Für  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633, magenta) wurden eine Immunfärbung durchgeführt. Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI visualisiert (blau). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.



**Abb. 3.14 Kolokalisation von  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry und eGFP-C-RAF**

Gezeigt sind repräsentative CLSM Aufnahmen von eGFP-C-RAF (grün) und  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry (rot) transfizierten SW480 Zellen ohne (-) oder mit (+) Stimulation durch EGF (100 ng/ml, 5 min). Für  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633, magenta) wurden eine Immunfärbung durchgeführt. Zellkerne wurden durch den Farbstoff DAPI visualisiert (blau). Eine Überlagerung der Signale von eGFP-C-RAF und  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry zeigte sich gelb (Pfeile). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

SW480 Zellen im gesamten Zytoplasma, nicht jedoch im Zellkern detektierbar (Abb. 3.13). Die Stimulation der eGFP-C-RAF exprimierenden Zellen mit EGF erzeugte unter diesen Bedingungen keine eindeutige Lokalisation von C-RAF an der Zellmembran. Möglicherweise war die Menge an eGFP-C-RAF innerhalb der Zellen zu hoch oder das exprimierte Protein nicht aktiv. Die einzeln transfizierten Kontrollen waren für das jeweils andere Fluoreszenzsignal negativ. In co-transfizierten Zellen konnte eine Kolokalisation von eGFP-C-RAF mit  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry beobachtet werden (Abb. 3.14).  $\Delta$ ssHTRA1(SA)-mCherry war an diesen Punkten nicht ausschließlich tubulär lokalisiert, was auf eine Bindung von HTRA1 an C-RAF hindeuten könnte. Die



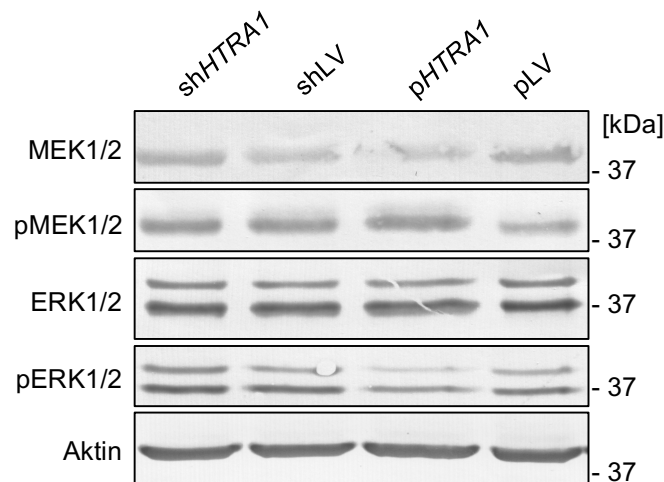
Spezifität dieser Kolo-kalisation war aufgrund der ubiquitären Verteilung von eGFP-C-RAF jedoch fraglich. Eine mathematische Bestimmung der Kolo-kalisation war aus dem gleichen Grund nicht durchführbar. Eine Stimulation der Zellen mit EGF hatte keinen Einfluss auf die Kolo-kalisation der Proteine.

Da die Kolo-kalisation von C-RAF und HTRA1 in der Nähe der Zellmembran am deutlichsten war, wurden mit transient transfizierten SW480 Zellen weitere Analysen mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese Methode ermöglichte eine sehr hohe Auflösung Membran naher Regionen der Zellunterseite. Die Untersuchung der Kolo-kalisation mittels TIRF wurde sowohl an fixierten als auch an lebenden Zellen vorgenommen, lieferte jedoch keine eindeutigeren Ergebnisse als die CLSM. Für eine quantitativere Beurteilung einer Kolo-kalisation wären deshalb andere Methoden, beispielsweise der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) in Kombination mit *Fluorescence Lifetime Imaging* (FLIM) oder ein *GFP-Split-System*, nötig.

### **3.3.5. Der Einfluss von HTRA1 auf die Aktivität des ERK-Signalweges**

Nachdem die Level der Raf Proteine und eine Kolo-kalisation von C-RAF mit HTRA1 in SW480 Zellen analysiert wurden, sollte auch der Einfluss von HTRA1 auf die Aktivität des ERK-Signalweges in den vier SW480 Zelllinien untersucht werden. Dazu wurden erneut Western Blot-Analysen (2.4.8) mit phospho-spezifischen Antikörpern (2.1.6) durchgeführt. Da die phosphorylierten Formen von MEK und ERK (pMEK, pERK) den aktiven Formen der Kinasen entsprechen, konnte die Menge an phosphorylierten Proteinen als ein Maß für die Aktivität des Signalweges genutzt werden. Dabei zeigten sich sowohl MEK1 und MEK2 (MEK1/2), als auch ERK1 und ERK2 (ERK1/2) in der Western Blot-Analyse als Doppelbande.

Zur Analyse der Aktivität des ERK-Signalweges in SW480 Zellen, wurden erneut von allen vier Zelllinien Lysate hergestellt (2.3.5). Auch hier wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ungefähr 80 % geerntet, die Proteinlysate mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und die Proteine anschließend in Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen die phosphorylierten oder gesamten Proteine immundetektiert (2.4.8). Im Rahmen dieser Analyse konnte keine Abweichung der Aktivität von MEK und ERK in



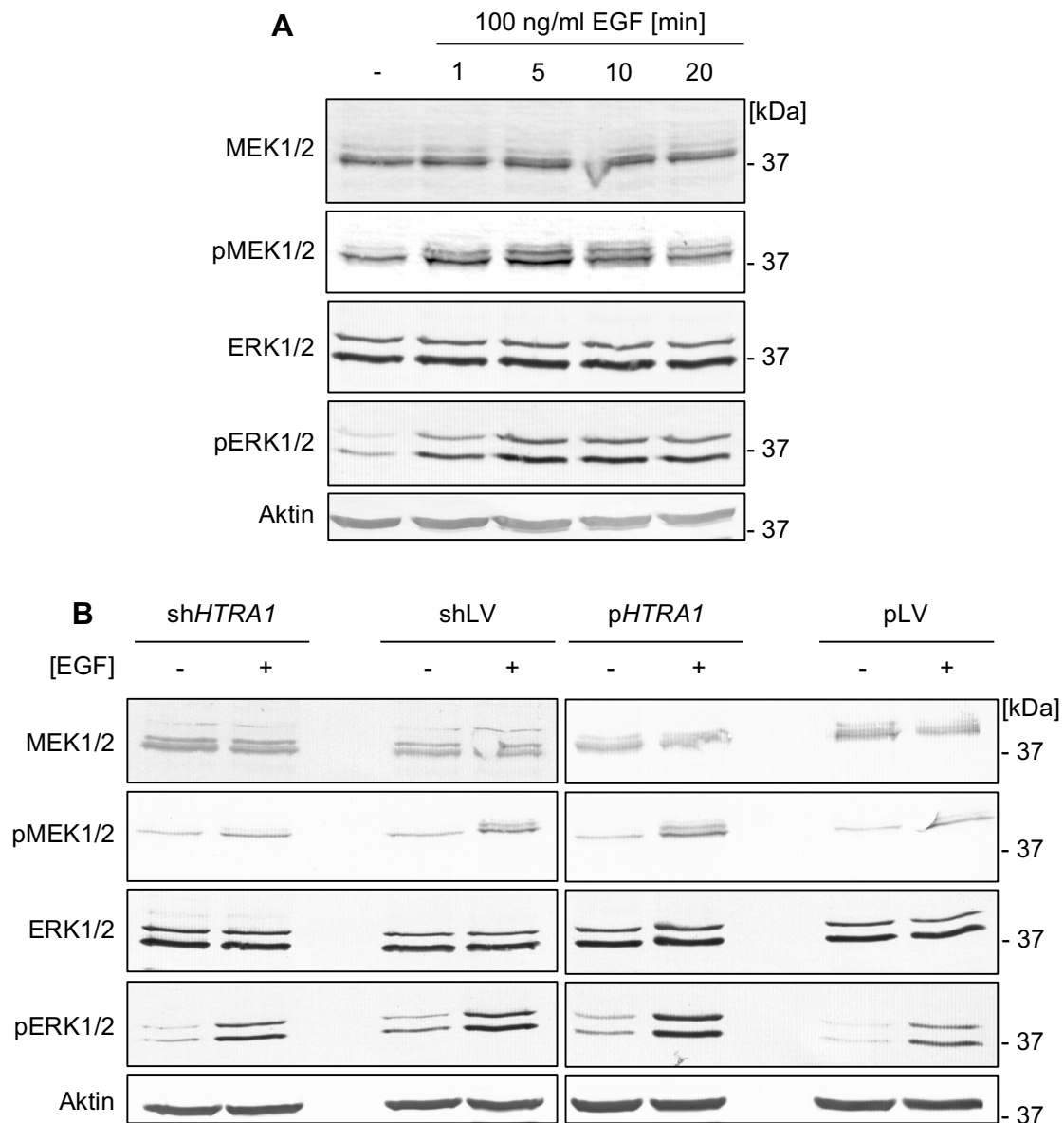
**Abb. 3.15 Western Blot-Analyse der ERK-Signalweg Aktivität in SW480 Zellen**

Gezeigt ist beispielhaft das Ergebnis einer Western Blot-Analyse von SW480 Zelllysaten (2.3.5, 2.4.8) mit anschließender Immundetektion von MEK1/2 und ERK1/2 sowie den phosphorylierten Varianten der Proteine (pMEK1/2, pERK1/2). Aktin diente als Ladekontrolle.

den vier SW480 Zelllinien beobachtet werden (Abb. 3.15). Bei der hier gezeigten Western Blot-Analyse ließen sich geringe Unterschiede in der Menge an pERK in *pHTRA1* Zellen erkennen, jedoch waren diese Unterschiede in den durchgeführten Experimenten nicht konstant zu beobachten. Auch eine Quantifizierung der Banden mit der Fiji Software (2.1.11) zeigte keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten Schritt sollte der Einfluss von HTRA1 auf die Induzierbarkeit der Aktivität des ERK-Signalweges getestet werden. Wie in 1.5 beschrieben, wird eine Aktivierung der Signalkaskade durch RTKs wie den EGF-Rezeptor nach Bindung eines Wachstumsfaktors wie EGF vermittelt. Um diese Stimulation untersuchen zu können, wurden die Zellen 24 h vor der Substitution des Mediums mit EGF in Serum-freiem Medium kultiviert. Die Behandlung parentaler SW480 Zellen mit 100 ng/ml EGF in Serum-freiem Medium für 1, 5, 10 oder 20 min führte zu einer steigenden Menge phosphorylierter Proteine bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge von MEK1/2 und ERK1/2 (Abb. 3.16A). Dabei war die größte Zunahme bereits nach 5 min und eine Abnahme der Phosphorylierung nach 20 min zu beobachten. Für folgende Experimente wurden die Zellen deshalb mit einer Konzentration von 100 ng/ml EGF für 5 min behandelt, bevor die Zellen geerntet und aufgeschlossen wurden. Die Aktivität von MEK1/2 und ERK1/2 durch EGF konnte unter den etablierten Bedingungen in allen vier SW480 Zelllinien induziert werden (Abb. 3.16B). Über die

durchgeführten Experimente ließ sich kein Unterschied in der Induktion des ERK-Signalweges beobachten. In dem hier gezeigten repräsentativen Ergebnis einer Western Blot-Analyse ließen sich geringe Unterschiede in der Aktivierbarkeit von MEK und ERK in *shHTRA1* (weniger) und *pHTRA1* (mehr) Zellen erkennen. Eine differentielle Aktivierbarkeit ließ sich in den durchgeführten Experimenten jedoch für keine der Zelllinien reproduzierbar nachweisen.



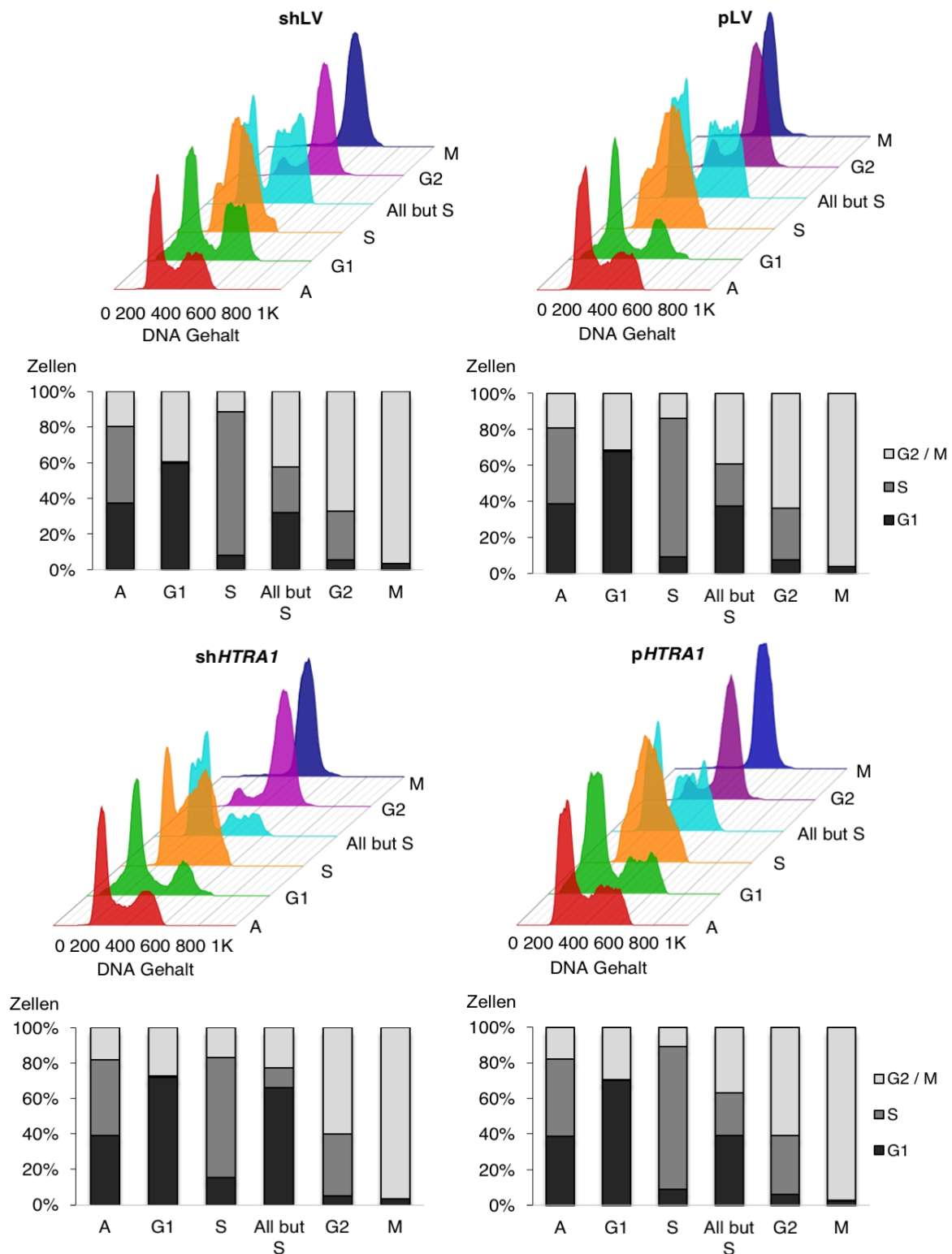
**Abb. 3.16 Induktion der ERK-Signalweg Aktivität durch Gabe von EGF**

Western Blot-Analysen von SW480 Zelllysaten (2.3.5) mit anschließender Immundetektion von MEK1/2 und ERK1/2 sowie der phosphorylierten Proteine (pMEK1/2, pERK1/2). Aktin diente als Ladekontrolle. **A)** Inkubation von SW480 Zellen (Par) mit 100 ng/ml EGF (in 10 mM Essigsäure) in Serum-freiem Medium für 1, 5, 10 und 20 min oder der entsprechenden Menge 10 mM Essigsäure (-). **B)** Inkubation von vier SW480 Zelllinien mit 100 ng/ml EGF (+) oder der entsprechenden Menge 10 mM Essigsäure (-) für 5 min in Serum-freiem Medium.

### 3.3.6. Die Synchronisation von SW480 Zellen

Um zu untersuchen, ob HTRA1 Zellzyklus abhängig Einfluss auf die Aktivität des ERK-Signalweges nimmt, wurde die Synchronisation von SW480 Zellen in definierten Zellzyklusphasen etabliert. Diese Experimente waren wichtig, weil ein Zellzyklus spezifischer Effekt von HTRA1 in einer heterogenen Zellpopulation eventuell nicht erkennbar war. Für die G1-, S-, G2- und M-Phase wurde jeweils ein eigenes Synchronisationsprotokoll entwickelt (2.3.8). Während dieser Entwicklungsphase wurde eine weitere Bedingung etabliert, die Zellen aller Zellzyklusphasen außer der S-Phase enthielt. Diese Zellen werden im Folgenden als „All but S“ bezeichnet. Sie wurden in einige Experimente eingebunden, weil die S-Phase die längste Zellzyklusphase darstellt. Die „All but S“-Population enthält daher Zellen der unterrepräsentierten Phasen einer asynchronen Zellpopulation. Die Synchronisation der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (2.3.9) überprüft. Zur Bestimmung des DNA Gehaltes wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit PI gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen 30 min vor Fixierung mit 10  $\mu$ M Bromodesoxyuridin (BrdU) behandelt. Das Thymin-Analogon BrdU wird von Zellen während der DNA Replikation eingebaut und kann somit verwendet werden, um S-Phase Zellen zu visualisieren. Diese wurden anschließend mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen BrdU gefärbt (BrdU-FITC). Die Zusammenfassung eines repräsentativen Ergebnisses der Synchronisation von SW480 Zellen ist in Abb. 3.17 dargestellt. Detektierte Zellen wurden so gefiltert, dass nur Einzelzellen für die Analyse der Zellzyklusphasen verwendet wurden. Zelltrümmer und Dubletten wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Einzelzellen in G1-, S-, und G2/M-Phase wurde bestimmt und in einem Diagramm je Zelllinie und Synchronisation zusammengefasst. Asynchrone Zellen dienten dabei als Kontrolle. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 8.1 - Abb. 8.4.

Für die Synchronisation von Zellen in G1- und M-Phase wurde jeweils ein einzelner Thymidin-Block durchgeführt. Nachdem das Thymidin ausgewaschen war, verblieben die Zellen 4,5 h in normalem RPMI Medium, bevor die Zellen für 14 h in RPMI Medium mit 100 ng/ml Nocodazol kultiviert wurden. Danach wurden M-Phase Zellen mittels *mitotic shake off* geerntet. Um G1-Phase Zellen zu erhalten, wurden die Zellen nach dem *mitotic shake off* gewaschen und erneut ausplattiert, bevor sie 4 h später geerntet

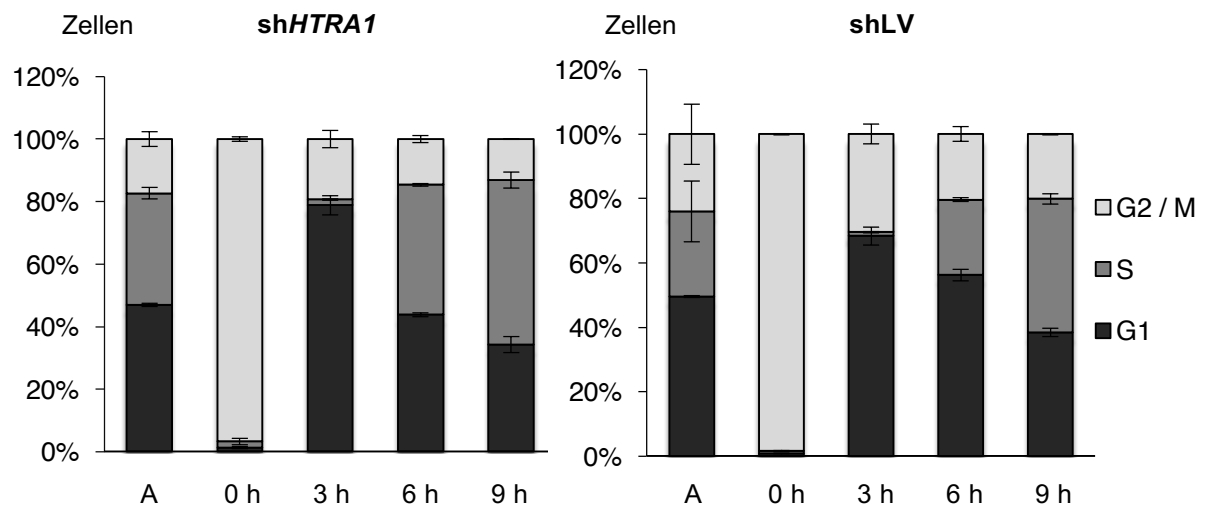


**Abb. 3.17 Synchronisation von SW480 Zellen**

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von synchronisierten SW480 Zellen. Um den DNA Gehalt der Zellen zu bestimmen, wurden diese mit PI gefärbt (2.3.9). Die aufgenommenen Diagramme sind für jede Zelllinie gezeigt. Zusätzlich wurden die Zellen mit BrdU behandelt und mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt (BrdU-FITC), um replizierende Zellen zu visualisieren. Die Anzahl der Einzelzellen in G1-, S- und G2/M-Phase wurde bestimmt und in einem Balkendiagramm je Zelllinie und Synchronisationsart zusammengefasst. Asynchrone Zellen (A) dienen als Kontrolle. Für eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse siehe Abb. 8.1 - Abb. 8.4.

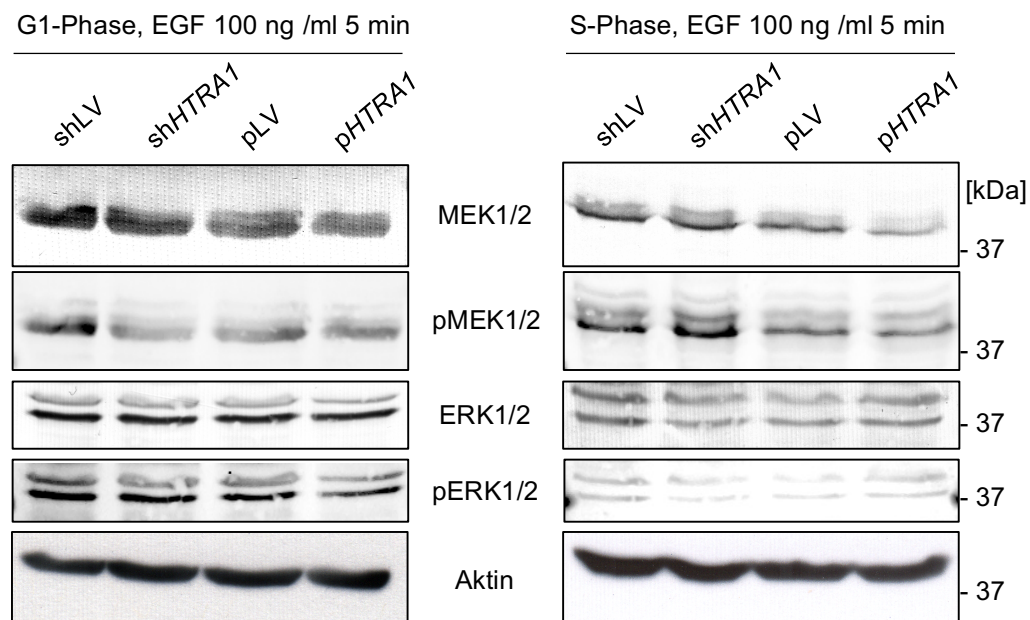
wurden. Dieser experimentelle Ablauf resultierte in einer Anreicherung von > 96 % M-Phase und 60 - 72 % G1-Phase Zellen (Abb. 3.17). Für eine Synchronisation in der S- oder G2-Phase wurde jeweils ein doppelter Thymidin-Block durchgeführt. S-Phase Zellen wurden 3 h nach Beendigung der zweiten Thymidin-Behandlung geerntet. G2-Phase Zellen wurden zusätzlich für 9 h mit einem Inhibitor der *Cyclin dependent kinase 1* (CDK1) behandelt, um einen Übertritt der Zellen in die M-Phase zu verhindern. Die synchronisierten Zellpopulationen zeigten eine Anreicherung von 68 - 80 % S-Phase und 61 - 67 % G2-Phase Zellen (Abb. 3.17). Für die Bedingung „All but S“ wurden die Zellen nach Behandlung mit dem CDK1-Inhibitor für 3 h (shHTRA1) bzw. 5 h (die drei anderen Zelllinien) in RPMI Medium kultiviert. Die übrig gebliebene Menge an S-Phase Zellen in dieser Kondition lag zwischen 11 - 26 %.

Im Rahmen der Etablierung der Synchronisation von SW480 Zellen konnte unter diversen Bedingungen beobachtet werden, dass shHTRA1 Zellen nach Synchronisation schneller die einzelnen Zellzyklusphasen durchliefen als die anderen Zelllinien. Daher mussten die shHTRA1 Zellen für die „All but S“ Synchronisation eher geerntet werden (3 h) als die anderen Zelllinien (5 h), um einen Eintritt der Zellen in die S-Phase zu verhindern. Auch bei anderen Synchronisationen wie beispielsweise während der S-Phase konnte dieser Effekt beobachtet werden. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurden shHTRA1 und shLV Zellen in der G2-Phase synchronisiert (2.3.8). Nach einer Auswaschung des CDK1-Inhibitors wurden die Zellen nach 0, 3, 6 und 9 h geerntet und wie beschrieben mit dem Durchflusszytometer analysiert. Eine Quantifizierung der Einzelzellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen zeigte, dass shHTRA1 Zellen schneller in die G1-Phase (78 % zu 68 % nach 3 h) und die S-Phase (41 % zu 23 % nach 6 h; 52 % zu 41 % nach 9 h) eintraten als die shLV Kontrolle (Abb. 3.18). Dieses Ergebnis steht in Übereinkunft damit, dass shHTRA1 Zellen in den gemessenen Wachstumskurven (Abb. 3.3) ein schnelleres Wachstum zeigten als die anderen Zelllinien. Die experimentellen Daten legen deshalb erneut eine Deregulierung von Zellzykluskontrollpunkten nahe.



**Abb. 3.18 Beobachtung der Zellzyklusphase von shHTRA1 und shLV Zellen nach Synchronisation in der G2-Phase**

Quantifizierung von Einzelzellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie. shHTRA1 und shLV Zellen wurden in der G2-Phase synchronisiert (2.3.8). 0, 3, 6 und 9 h nach Auswaschen des CDK1-Inhibitors wurden Proben zur Messung am Durchflusszytometer entnommen, fixiert und mit PI und BrdU gefärbt (2.3.9). Zelltrümmer und Dubletten wurden aus der Analyse ausgeschlossen. n = 3 unabhängige Experimente, je in Triplikaten, mit Standardabweichung.



**Abb. 3.19 Induktion der ERK-Signalweg Aktivität in G1- und S-Phase des Zellzyklus**

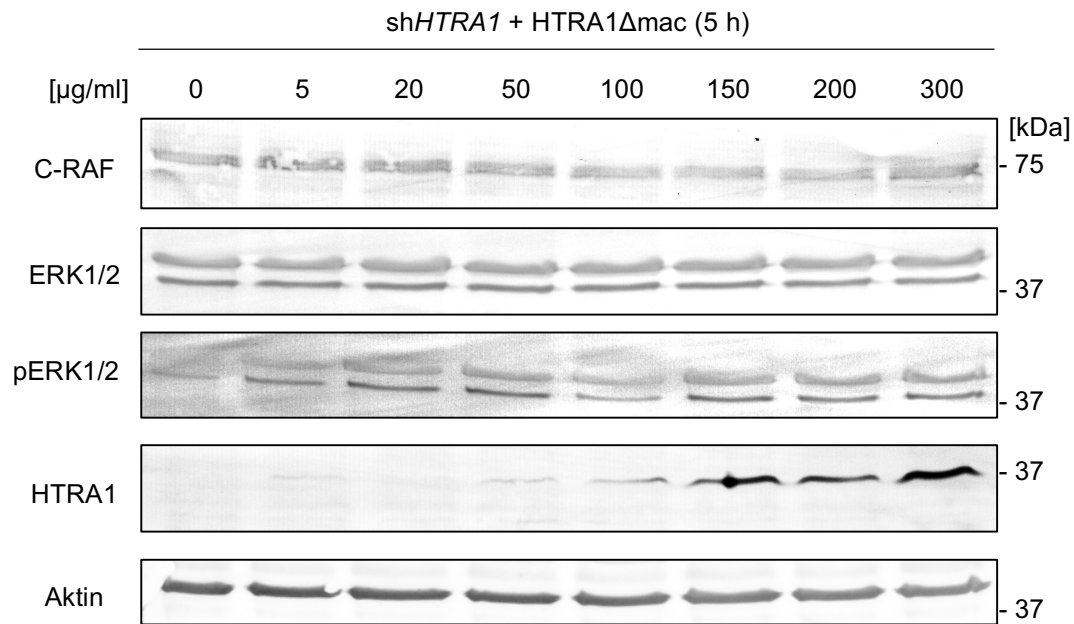
Western Blot-Analysen aus Zelllysaten (2.3.5, 2.4.8) von synchronisierten SW480 Zellen in G1- oder S-Phase (2.3.8) mit anschließender Immundetektion von MEK1/2, ERK1/2 und dem phosphorylierten Anteil der Proteine (pMEK1/2, pERK1/2). Zur Aktivierung des ERK-Signalweges wurden die vier SW480 Zelllinien 5 min mit 100 ng/ml EGF in Serum-freiem Medium inkubiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen, ob HTRA1 einen Zellzyklus abhängigen Effekt auf die Induktion der ERK-Signalweg Aktivität hat, wurden SW480 Zellen in G1- und S-Phase synchronisiert. Nach Inkubation der Zellen in Serum-freiem Medium für 24 h, wurde die Aktivität des Signalweges mit EGF induziert (100 ng/ml, 5 min). Anschließend wurden von allen vier Zelllinien Proteinlysate hergestellt (2.3.5). Die isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und in Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen MEK1/2 und ERK1/2, sowie pMEK1/2 und pERK1/2 immundetektiert (2.4.8). Weder in G1- noch in S-Phase Zellen konnte eine Abweichung der Aktivität von MEK oder ERK in den vier SW480 Zelllinien beobachtet werden (Abb. 3.19). Auch in synchronisierten Zellen ohne EGF Behandlung oder bei einer längeren Zugabe von EGF (100 ng/ml, 45 min) konnten keine Unterschiede zwischen den Zelllinien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.3.7. Der Einfluss von rekombinantem HTRA1 auf die ERK-Signalweg Aktivität**

Durch eine stabile Überexpression oder Repression der *HTRA1* Expression konnte unter den beschriebenen Bedingungen kein Einfluss auf den ERK-Signalweg beobachtet werden. Um auszuschließen, dass ein Effekt von HTRA1 durch einen Adaptationsmechanismus der stabilen SW480 Zellen aufgehoben wurde, sollten sh*HTRA1* Zellen erneut mit HTRA1 substituiert werden. In anderen Arbeiten (Dissertation Simon Pöpsel) wurde beobachtet, dass humane Zellen in der Lage waren rekombinantes HTRA1 $\Delta$ mac oder  $\Delta$ PDZ aufzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden SW480 Zellen deshalb für 5 h mit aktivem HTRA1 $\Delta$ mac in Serum-freiem Medium inkubiert. Da in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, dass sich ein Serumentzug positiv auf die HTRA1 Aufnahme auswirkte, wurde das Serum vorab für 24 h entzogen. Anschließend wurde HTRA1 $\Delta$ mac in 7 verschiedenen Konzentrationen von 5 bis 300  $\mu$ g/ml Medium zu sh*HTRA1* Zellen gegeben. Nach 5 h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Zelltrümmer sedimentiert (2.3.5). Die entstandenen Proteinlysate wurden mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und in einer Western Blot-





**Abb. 3.20 Einfluss von rekombinantem HTRA1Δmac auf die ERK-Signalweg Aktivität in shHTRA1 Zellen**

Western Blot-Analysen von SW480 shHTRA1 Zelllysaten (2.3.5) mit anschließender Immundetektion von ERK1/2 und phosphoryliertem ERK (pERK1/2). Den Zellen wurde für 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde aktives HTRA1Δmac zu den Zellen gegeben. Die Menge des verwendeten HTRA1 lag zwischen 5 – 300 μg/ml Medium. Als Kontrolle wurden die Zellen mit PBS behandelt. Aktin diente als Ladekontrolle.

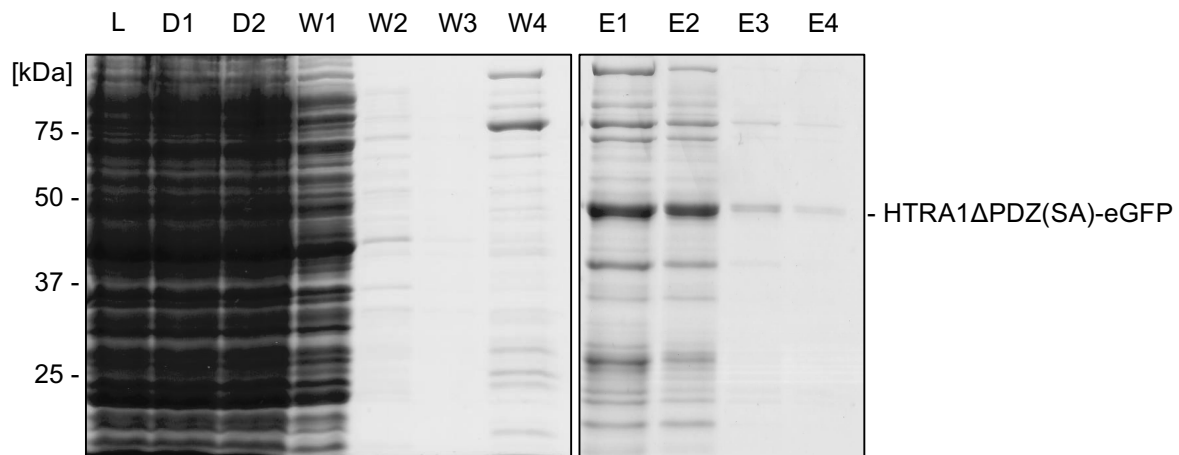
Analyse (2.4.8) mit Antikörpern gegen HTRA1, C-RAF und ERK1/2, sowie phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) immundetektiert (Abb. 3.20). Die Aufnahme von HTRA1Δmac in shHTRA1 Zellen konnte ab einer Konzentration von 50 μg/ml Medium detektiert werden. Die Menge des aufgenommenen HTRA1Δmac nahm dabei konzentrationsabhängig zu. Die größte Menge HTRA1 wurde somit bei einer Konzentration von 300 μg/ml Medium detektiert. Durch die Substitution von shHTRA1 Zellen mit aktivem HTRA1Δmac konnte kein eindeutiger Unterschied in der Induktion des ERK-Signalweges nachgewiesen werden. In dem hier gezeigten repräsentativen Ergebnis einer Western Blot-Analyse, zeigten die Zellen eine leichte Induktion von pERK1/2. Dieser Effekt war jedoch sehr gering und ließ sich in weiteren Experimenten nicht eindeutig nachweisen. Auch die Verwendung anderer Konzentrationen des rekombinanten Proteins, kürzere oder längere Inkubationszeiten oder eine wiederholte Zugabe von HTRA1Δmac konnten diesen Effekt nicht verstärken (Daten nicht gezeigt). Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Einfluss von HTRA1 auf die Aktivität des ERK-Signalweges nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### 3.4. Die Aufnahme von HTRA1 in SW480 Zellen

Wie in 3.3.7 und anderen Arbeiten (Dissertation Simon Pöpsel) beschrieben, können eukaryotische Zellen rekombinantes HTRA1 spontan aufnehmen, wenn das Protein dem Medium mehrere Stunden zugesetzt wird. Der Mechanismus dieser Aufnahme ist unbekannt. Darüber hinaus könnte die spontane Aufnahme von Proteinen in humane Zellen für Anwendungen in Klinik und Forschung von großem Nutzen sein. Da rekombinantes HTRA1 von humanen Zellen spontan aufgenommen wird, könnte HTRA1 theoretisch als ein Transporter für andere Proteine dienen. Dazu müssten die Zielproteine an HTRA1, beispielsweise an Stelle der PDZ Domäne, fusioniert werden. Um diese Theorie zu überprüfen, wurden die cDNA-Sequenzen der proteolytisch inaktiven Proteasedomäne von humanem HTRA1 (HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)) und des *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) in den Expressionsvektor pET21d kloniert (2.1.4). Das Fusionsprotein war so konstruiert, dass HTRA1 über einen sechs Aminosäure langen Linker (EFGSGS) mit eGFP (C-terminal) verbunden war. Am N-Terminus war das Protein an einen His<sub>6</sub>-Tag fusioniert, der für die Reinigung des Proteins benötigt wurde.

#### *Die Reinigung von rekombinantem HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP*

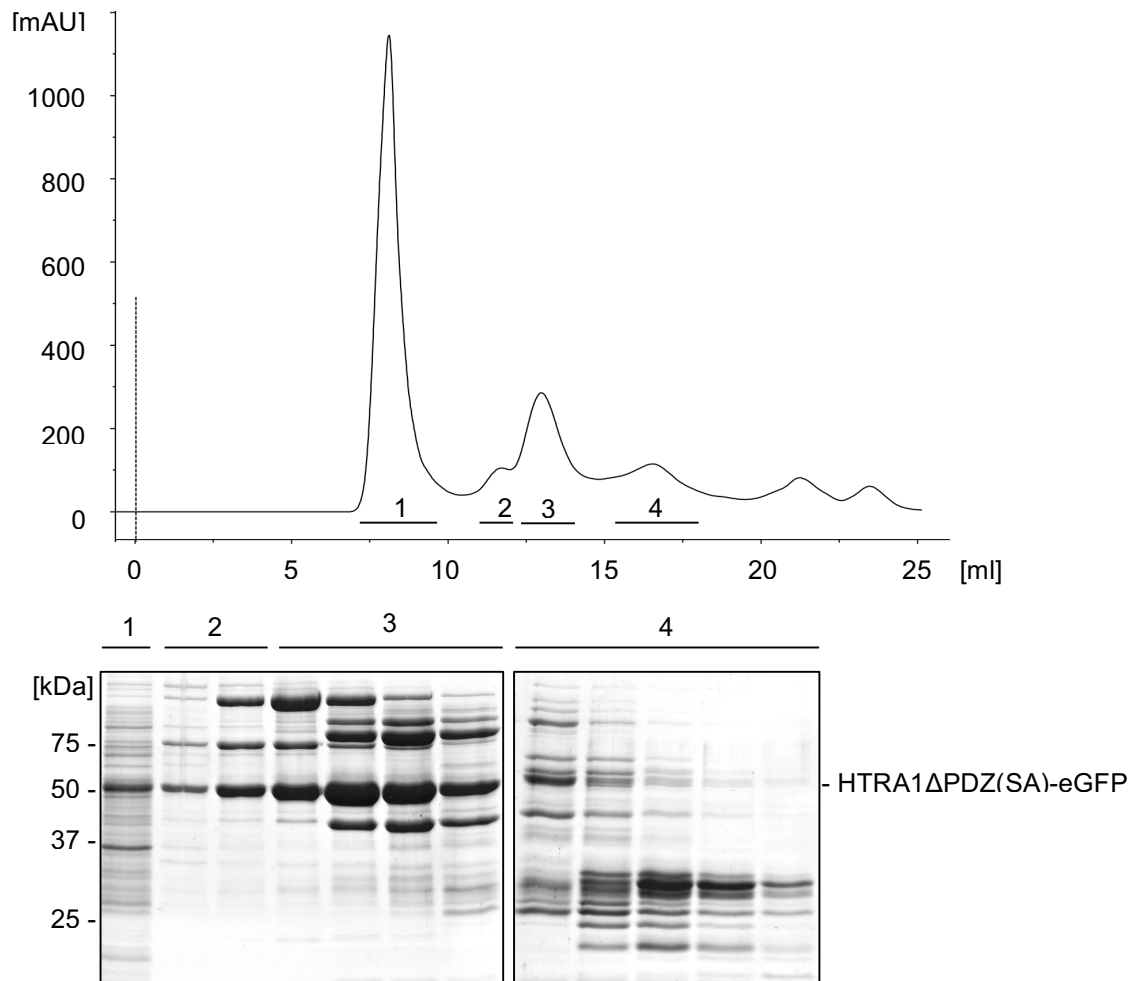
Für die Expression des rekombinanten HTRA1 wurde der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) Rosetta<sup>TM</sup> 2 gewählt (Tab. 2.1). Die Expression in Rosetta 2 Zellen wurde durch 0,5 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 induziert und erfolgte bei 24 °C für 5 h (2.4.1). Die *E. coli* Zellen wurden anschließend durch Zentrifugieren angereichert und an einer *French Press* mechanisch aufgeschlossen. Nach einer Sedimentation der Zelltrümmer wurde das Lysat der *E. coli* Zellen zunächst mittels Affinitätschromatographie im *Gravityflow*-Verfahren gereinigt (2.4.3) (Abb. 3.21). Hierzu wurde Protino NiTED-Material verwendet. Gebundenes HTRA1 wurde durch Imidazol von der stationären Phase eluiert. Proben der einzelnen Wasch- und Elutionsschritte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.5) und die Proteine mit Coomassie-Brillant-Blau visualisiert (2.4.6). Jene Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden vereinigt und in einem Konzentrator (Vivaspin, Sartorius) mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa auf ein Endvolumen von 3 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde dann mittels präparativer SEC an einer FPLC



**Abb. 3.21 Reinigung von HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP mittels Affinitätschromatographie**

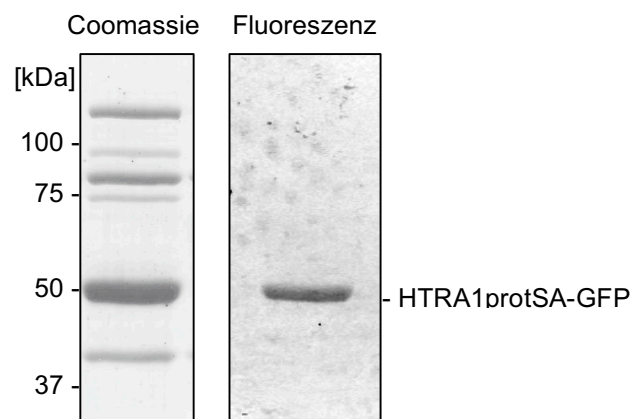
Analyse der Reinigung von HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP (2.4.3) mittels SDS-PAGE (2.4.5). Proteine wurden mit Coomassie-Brillant-Blau visualisiert (2.4.6). Das Lysat der BI21 (DE3) Rosetta™ 2 Zellen (L) wurde mit 2 g Protino NiTED-Säulenmaterial über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Durchfluss der Affinitätschromatographie (D1) wurde ein zweites Mal auf die Säule geladen (D2). Verunreinigungen wurden in drei Waschschritten mit dem Lysepuffer (50 mM Natriumphosphat pH 7,4, 300 mM NaCl) (W1-W3) und einem Waschschriff mit dem gleichen Puffer und zusätzlich 1 M NaCl (W4) entfernt. Das Zielprotein wurde in vier Schritten (E1-4) durch Zugabe von Lysepuffer mit 250 mM Imidazol vom Säulenmaterial eluiert.

Anlage der Größe nach aufgetrennt (Abb. 3.22). Hierzu wurde eine Chromatographiesäule vom Typ Superdex 200 10/300 GI verwendet. Die SEC zeigte vier Peaks. Peak 1 bei 7,7 ml Elutionsvolumen entsprach etwa dem Ausschlussvolumen der Säule. Peak 2 bei 11,1 ml Elutionsvolumen entsprach laut Kalibrierung mit einem Proteinstandard einer Masse von ca. 377 kDa. Das HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP Trimer hatte eine berechnete Masse von 156,75 kDa (Monomer = 52,25 kDa) und entsprach somit am ehesten Peak 3 mit einem Elutionsvolumen von 12,35 ml bzw. ca. 195 kDa. Peak 4 bei 15,8 ml Elutionsvolumen entsprach einer Masse von ca. 33 kDa. Die Fraktionen von Peak 3 wurde vereinigt und in einem Konzentrator (Vivaspin, Sartorius) mit einem Größenausschlussvolumen von 10 kDa auf eine Konzentration von 2 mg/ml konzentriert. Das konzentrierte Protein wurde erneut mittels SDS-PAGE analysiert (2.4.5). Nach einer Coomassie-Färbung wurde das Polyacrylamid-Gel zusätzlich an einem Fluoreszenzspektrometer (Typhoon FLA 9500) gemessen. Nur eine Bande bei ca. 50 kDa zeigte in der spektrometrischen Messung ein Fluoreszenzsignal (Abb. 3.23).



**Abb. 3.22 SEC von HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP**

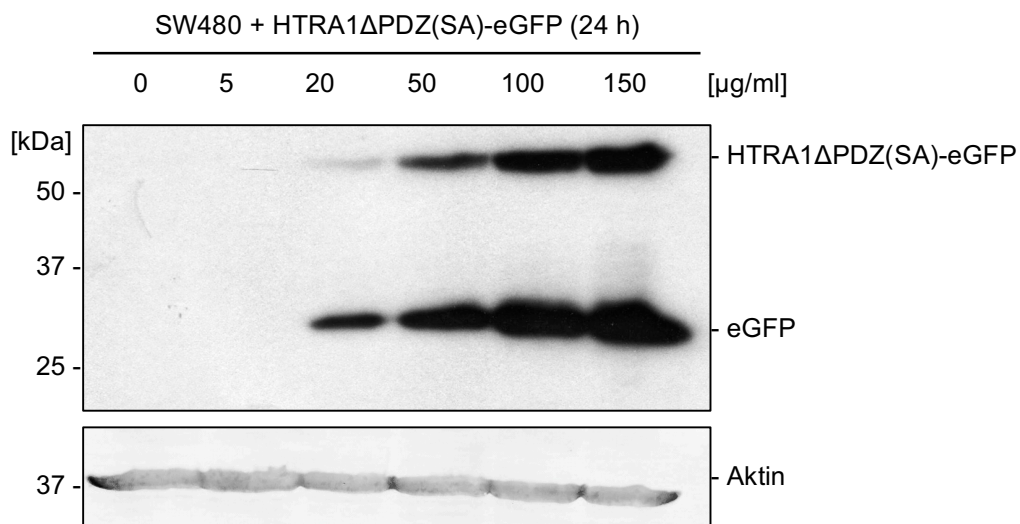
Gezeigt sind das Chromatogramm der Reinigung von HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP mittels SEC an einer FPLC Anlage (2.4.3) und die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (2.4.5, 2.4.6).



**Abb. 3.23 Analyse des gereinigten HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP**

Nach Reinigung des gereinigten HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP wurde das konzentrierte Protein erneut mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (2.4.5, 2.4.6). Im Anschluss wurde das Polyacrylamid-Gel auch an einem Fluoreszenzspektrometer (Typhoon FL) gemessen.

Um zu untersuchen ob das gereinigte HTRA1ΔPDZ(SA) mitsamt fusioniertem eGFP in humane Zellen aufgenommen werden kann, wurden parentale SW480 Zellen in Serum-freiem Medium für 24 h mit 5, 20, 50, 100 oder 150 µg des gereinigten HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP (Abb. 3.23) pro ml Medium inkubiert. PBS diente dabei als Kontrolle. Die Zellen wurden anschließend mit Trypsin-EDTA geerntet, um außen verbliebenes HTRA1 zu entfernen und anschließend aufgeschlossen (2.3.5). Zelluläre Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.5) und in einer Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion (2.4.8) visualisiert (anti-eGFP). Das gereinigte Fusionsprotein mit einer berechneten Masse von 52,25 kDa konnte ab einer Proteinkonzentration von 20 µg/ml in den SW480 Zelllysaten detektiert werden (Abb. 3.24). Mit steigender Konzentration des Fusionsproteins im Medium, stieg auch die detektierte Menge innerhalb der Zelle. Neben einer Bande bei knapp über 50 kDa, konnte eine weitere Bande detektiert werden. Diese Bande hatte eine Größe von etwas mehr als 25 kDa. Diese Bande wurde vom Antikörper gegen eGFP erkannt und entsprach etwa der Größe von eGFP (25 kDa). Es handelt sich hierbei vermutlich um eGFP, welches nach der Aufnahme in die Zelle vom Fusionsprotein abgespalten wurde. Verglichen mit dem Fusionsprotein machte daas abgespaltene eGFP einen Großteil des aufgenommenen Proteins aus. HTRA1ΔPDZ(SA) alleine konnte nicht



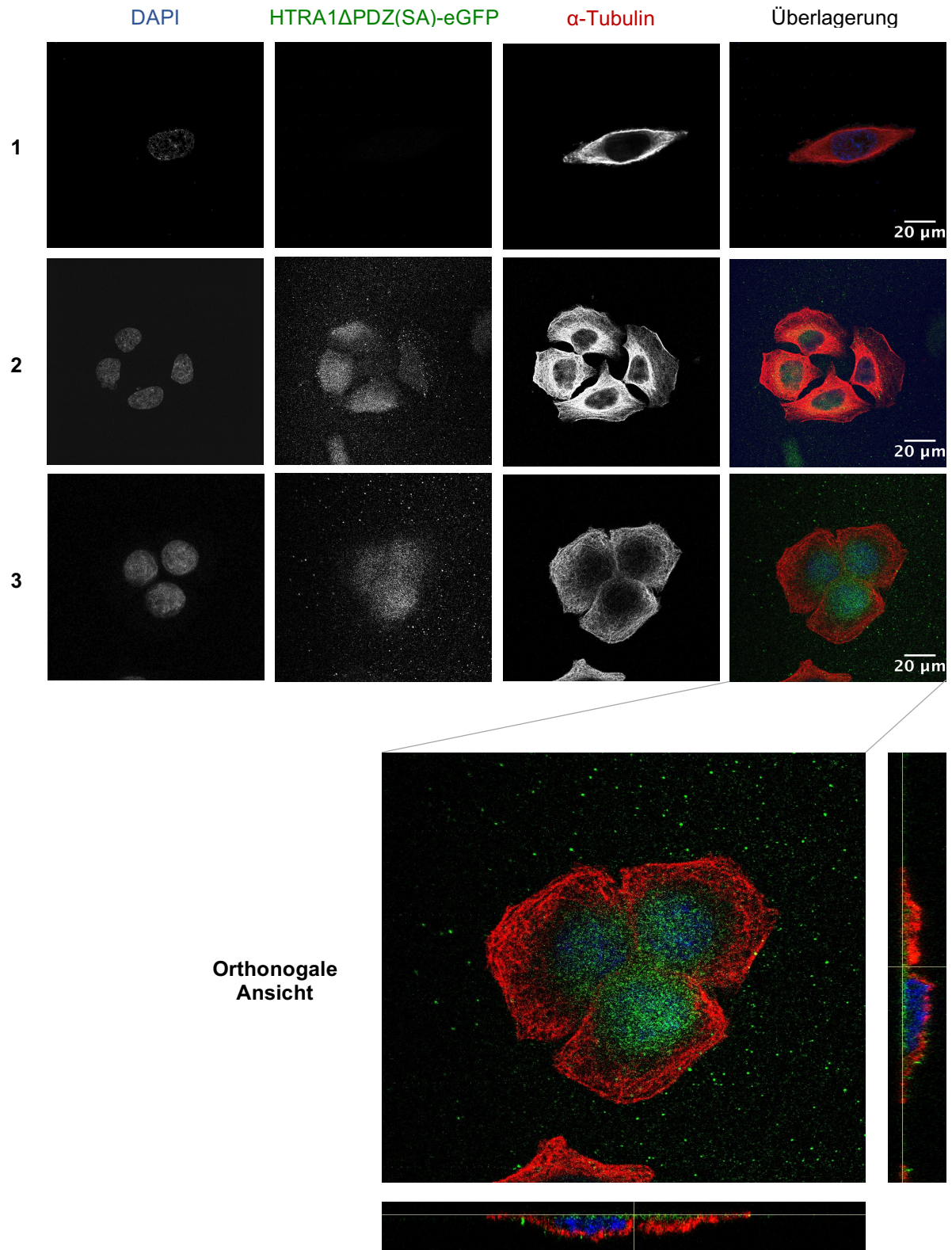
Gezeigt ist eine Western Blot-Analyse (2.4.8) von SW480 Zelllysaten nach Behandlung mit 0, 5, 20, 50, 100 oder 150 µg des gereinigten HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP pro ml Medium (2.3.12). PBS diene als Kontrolle. Die Immundetektion erfolgte mit einem Primärantikörper gegen eGFP und einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (2.1.6). Aktin diene als Ladekontrolle.

detektiert werden, da kein Antikörper gegen die Proteasedomäne von HTRA1 verfügbar war. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse zeigten eine Dosis abhängige Aufnahme des Fusionsproteins HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP in SW480 Zellen. Darüber hinaus deuteten die Ergebnisse auf die Spaltung eines großen Anteils des Fusionsproteins in HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA) und eGFP hin. Ein Zielprotein kann also möglicherweise mit HTRA1 in die Zelle transportiert werden, um dort wieder vom Fusionsprotein abgespalten zu werden und seine eigene Funktion auszuführen.

Zusätzlich zur Western Blot-Analyse wurde die Aufnahme des auto-fluoreszierenden Fusionsproteins mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (*Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM) analysiert (2.3.11). Hierzu wurden SW480 Zellen in Kulturschalen auf Deckgläschen angezogen. Nach einem Serumentzug für 24 h wurden die Zellen in Serum-freiem Medium mit 50  $\mu$ g HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP/ml Medium für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Um die Lokalisation innerhalb der Zelle bestimmen zu können, wurde der Zellkern mit dem Farbstoff DAPI und das Zytoskelett der Zelle mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin gefärbt. Die Analyse der Proben mit dem Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop zeigte ein disperses eGFP Signal in den Zellen, die zuvor mit HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA)-eGFP inkubiert worden war (Abb. 3.25). Das Signal war sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu beobachten. Eine orthogonale Ansicht der XZ- und YZ-Achsen eines *Z-Stacks* verdeutlichte diese Beobachtung. Dass ein Fluoreszenzsignal für eGFP innerhalb der Zelle detektiert werden konnte, ließ auf die Integrität des Proteins nach der Aufnahme schließen. In den PBS behandelten Kontrollen konnte kein Signal für eGFP detektiert werden.

Zusammengefasst unterstützten sowohl die experimentellen Daten der Western Blot-Analyse als auch der Analyse mittels CLSM die Theorie, dass HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA) in humane Zellen aufgenommen werden und dabei ein fusioniertes Protein in die Zelle transportieren kann. Dieses Protein wird nach der Aufnahme in die Zellen vermutlich zu einem Teil vom Fusionsprotein abgespalten und ist dennoch weiterhin intakt.





**Abb. 3.25 Lokalisation von HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP in SW480 Zellen**

Gezeigt ist beispielhaft die intrazelluläre Lokalisation von HTRA1ΔPDZ(SA)-eGFP (grün) in SW480 Zellen. Die Zellen wurden für 6 h entweder mit 50  $\mu$ g/ml rekombinantem HTRA1 (2 und 3) oder der entsprechenden Menge PBS (1) inkubiert. Das Zytoskelett wurde durch  $\alpha$ -Tubulin (Maus, Sekundärantikörper Alexa-633, rot) und die Zellkerne durch DAPI (blau) gefärbt. Der Maßstab entspricht 20  $\mu$ m. Die orthogonale Ansicht der XZ- und YZ-Achsen eines Z-stacks verdeutlicht die intrazelluläre Lokalisation.

### 3.5. Eine HTRA1 abhängige Proteom-Analyse über den Zellzyklus

Die pleiotropen Phänotypen von Zellen mit verringerter *HTRA1* Expression wie beispielsweise ein verstärktes Zellwachstum, Zentrosomen Amplifikationen und Poliploidy (Schmidt *et al.*, 2016) deuten auf eine Rolle der Serinprotease HTRA1 in der Regulation des Zellzyklus hin. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Entstehung von Tumoren interessant, da *HTRA1* in vielen Tumorarten epigenetisch herunter reguliert ist (Baldi *et al.*, 2002, Chien *et al.*, 2004). Theoretisch müssten sich die beobachteten Phänotypen in einem Unterschied der Abundanz von Proteinen widerspiegeln. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind jedoch oft sehr komplex und das Resultat einer Kombination direkter und indirekter Effekte, sowie einer Adaptation der Zellen auf miss-regulierte Prozesse. Um diese Prozesse zu analysieren und die beschriebenen Phänotypen, auch im Hinblick auf die *in vivo* Studie (3.1), besser zu verstehen, wurde eine Proteom-Analyse der vier SW480 Zelllinien durchgeführt. Hierzu wurden sowohl asynchrone als auch synchronisierte Zellen verwendet.

Der Ablauf der einzelnen Synchronisationsprotokolle wurde bereits in Abschnitt 3.3.6 erläutert. Für jede Zellzyklusphase (G1, S, G2, M, „All but S“, asynchron) wurden fünf unabhängige biologische Replikate produziert. Für ein Replikat pro Zelllinie und Zellzyklusphase wurde die Synchronisation mittels Durchflusszytometrie überprüft (2.3.9). Die Zellen wurden dafür mit PI und BrdU gefärbt. Die Ergebnisse der Messung wurden in Abb. 3.17 dargestellt und in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. Eine ausführliche Darstellung findet sich in Abb. 8.1 - Abb. 8.4.

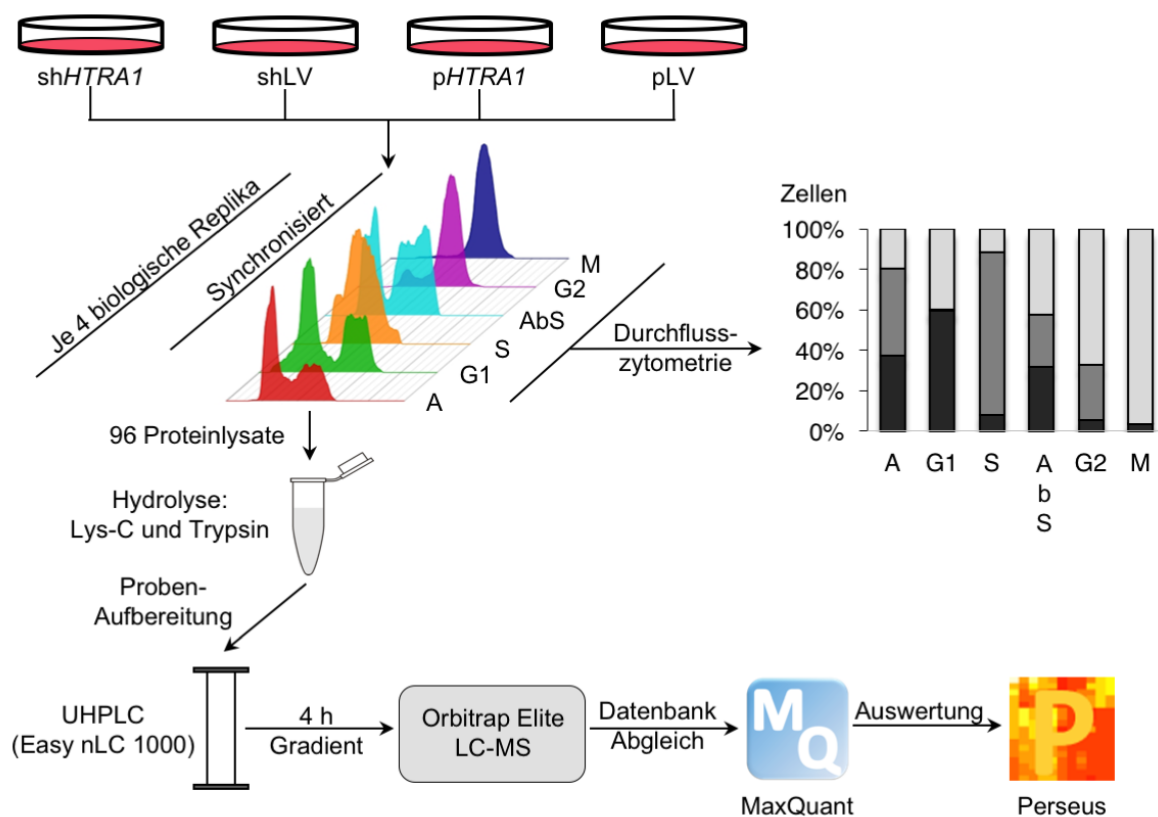
Eine schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Proteom-Analyse ist in Abb. 3.26 gezeigt (2.4.15). Für die verbliebenen 96 Proben (4 Zelllinien x 6 Bedingungen x 4 Replikate) wurden die Zellen geerntet, in 8 M Urea/PBS lysiert, reduziert und unter denaturierenden Bedingungen alkyliert. Die isolierten Proteine wurden mittels Lys-C und Trypsin hydrolysiert. Im Anschluss wurden die Peptide aufgereinigt, mittels UHPLC aufgetrennt und in die Orbitrap Elite LC-MS eingespeist. Die detektierten Massen wurden aufgezeichnet und die zugehörigen Proteine simultan in einer Datenbank Abgleich mittels MaxQuant Software identifiziert<sup>8</sup>. Insgesamt

---

<sup>8</sup> Die Aufbereitung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Svenja Blaskowski (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland), die Messung der Proben mittels LC-MS und Identifikation der Peptide mit der MaxQuant Software erfolgte durch Dr. Farnusch Kaschani (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland)



wurden 6864 Proteine identifiziert. Die ungefilterten Ergebnisse dieser Datenbanksuche wurden in die sogenannte PRIDE (*PR*oteomics *ID*entifications) Datenbank hochgeladen (proteinGroups.txt und peptide.txt). Die *label-free quantification* (LFQ) Intensitäten der Proteine wurden ebenfalls mit der MaxQuant Software ermittelt. Im Anschluss erfolgte die weitere Auswertung der Daten mittels Perseus Software (2.1.11). Die 6864 identifizierten Proteine wurden gefiltert. Proteine die in der *contaminants* oder *reversed database* auftauchten, sowie solche die als *only identified by site* markiert waren, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.



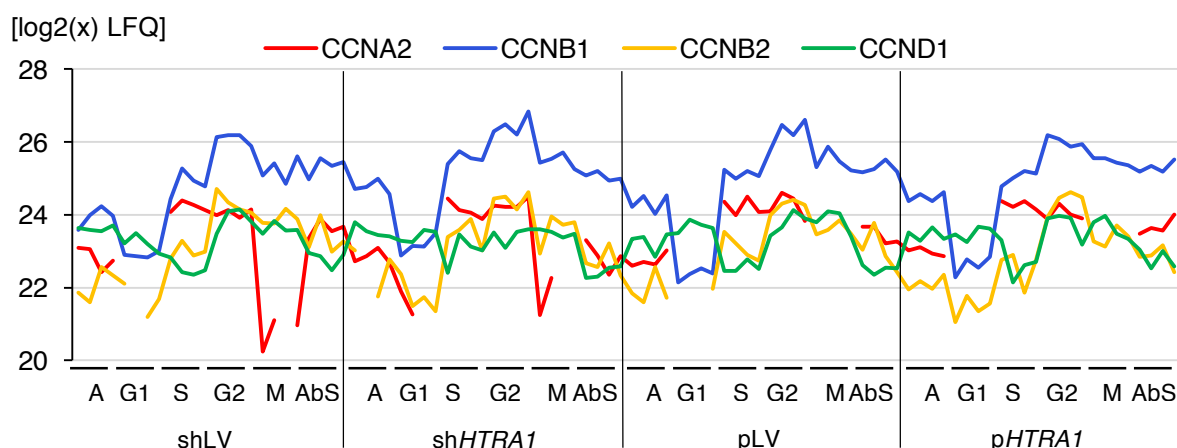
### Abb. 3.26 Arbeitsablauf der Proteom-Analyse

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte des Experimentes. Die vier SW480 Zelllinien mit verschiedenen HTRA1 Leveln wurden in allen vier Zellzyklusphasen synchronisiert. Eine fünfte Population enthielt Zellen aller Zellzyklusphasen außer der S-Phase („All but S“ = AbS). Asynchrone Zellen (A) dienten als Kontrolle. Für jede Zelllinie und Phase wurden vier unabhängige biologische Replikate für die Proteom-Analyse produziert. Ein fünftes Replikat wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (für die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse siehe Abb. 3.17 und Abb. 8.1 - Abb. 8.3). Die insgesamt 96 Proben (4 Zelllinien x 6 Bedingungen x 4 Replikate) wurden in 8 M Urea/PBS lysiert. Isolierte Proteine wurden durch Lys-C und Trypsin hydrolysiert. Die entstandenen Peptide wurden über C-18 Säulen aufgereinigt und mittels UHPLC aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Peptide in die Orbitrap Elite LC-MS eingespeist und die detektierten Massen aufgezeichnet. Die Daten wurden mit der MaxQuant und Perseus Software (Tab. 2.16) analysiert.

Von den übrig gebliebenen 6529 Proteinen wurden nur solche für die weitere Auswertung verwendet, die in mindestens 3 von 4 Replikaten in mindestens einer Bedingung identifiziert wurden. Dieser Filter wurde gewählt, um auch Proteine, die ihre Abundanz nur in einer Zelllinie und Zellzyklusphase ändern, nicht zu verlieren. Schlussendlich blieben nach diesem Filterungsprozess 5639 Proteine für die Auswertung der Proteom-Daten übrig. Von diesen 5639 Proteinen wurden 3441 in allen 96 LC-MS Läufen identifiziert (100 %) und 5036 in 48 LC-MS Läufen (50 %). Die aus MaxQuant berechneten LFQ Intensitäten wurden entsprechend einer Normalverteilung imputiert und logarithmiert (Basis 2). Als eine interne Qualitätskontrolle wurde zunächst der Pearson-Korrelationskoeffizient für alle 96 Datensätze untereinander berechnet. Der Koeffizient innerhalb eines Sets biologischer Replikate war immer  $> 0,983$  wobei ein Koeffizient = 1 einer Übereinstimmung von 100 % entspricht (Abb. 8.5). Dies war ein Hinweis dafür, dass die Datensätze der Replikate sehr ähnlich waren. Der Koeffizient zwischen Datensätzen unterschiedlicher Bedingungen war immer  $> 0,850$ , was darauf hindeutet, dass die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen Auswirkungen auf die analysierten Proteome hatten.

### 3.5.1. Eine Analyse des SW480 Proteoms über den Zellzyklus

Die Synchronisation der Zellen aus den unterschiedlichen Bedingungen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 3.17). Um eine korrekte Synchronisation zusätzlich zu verifizieren, wurde die Abundanz etablierter Regulatoren des Zellzyklus

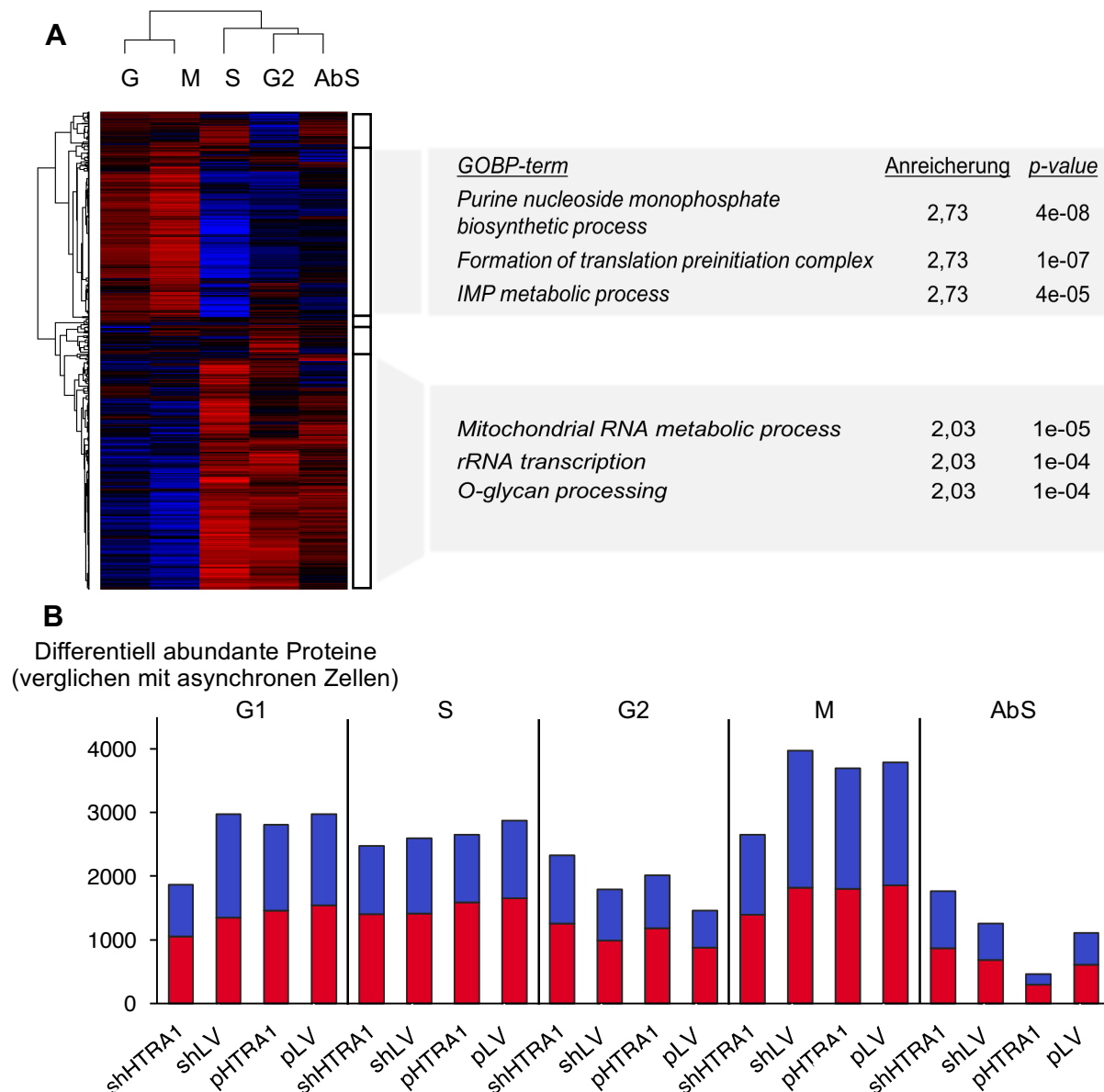


**Abb. 3.27 Abundanz Zellzyklus regulierender Cycline**

Die Abundanz der Cycline (CCN) A2, B1, B2 und D1 wurde über alle 96 Proben analysiert. Gezeigt sind die logarithmierten ( $\log_2(x)$ ) LFQ Intensitäten aus dem nicht-imputierten Datensatz. Jede Bedingung ist in Quadruplikaten repräsentiert. A = Asynchron; AbS = „All but S“

über die einzelnen Zellzyklusphasen analysiert (Abb. 3.27). Die Cycline A, B1/B2 und D schwankten über den Zellzyklus wie erwartet (Hydbring *et al.*, 2016). Cyclin E konnte nicht analysiert werden, da das Protein in keiner der 96 LC-MS Messungen identifiziert werden konnte.

Um einen ersten Überblick zu erhalten, ob die Abundanzen der gemessenen Proteine in Abhängigkeit vom HTRA1 Level und/oder der Zellzyklusphase variierten, wurden zwei unabhängige statistische Analysen durchgeführt. Zunächst wurde eine Z-Transformation für den gesamten Datensatz vorgenommen. Dann wurden die Mittelwerte der Quadruplikate berechnet und eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 3.28A). Dabei wurden alle identifizierten Proteine gegen die Zellzyklusphasen aufgetragen. Diese Analyse wurde für jede Zelllinie separat bzw. für shLV und pLV gemeinsam vorgenommen. Wie erwartet konnte in allen Zelllinien eine große Varianz in den Abundanzen der Proteine über den Zellzyklus beobachtet werden (Abb. 8.6). Diese Beobachtung wurde auch durch weitere statistische Tests (zweiseitige t-Tests, FDR = 0,05, S0 = 0,1) bestätigt, in denen die Datensätze synchronisierter Proben mit den Datensätzen asynchroner Proben der gleichen Zelllinie verglichen wurden. Die signifikant differentiell abundanten Proteine in den einzelnen Zellzyklusphasen wurden quantifiziert und ergaben bis zu 3972 signifikante Hits für eine einzelne Bedingung (Abb. 3.28B). Die größten Unterschiede waren in der M-Phase zu sehen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die M-Phase als kürzestes Phase des Zellzyklus in einer asynchronen Zellpopulation unterrepräsentiert ist. Anschließend wurden die differentiell abundanten Proteine jeder Bedingung auf eine signifikante Anreicherung von *GOBP-terms* (*gene ontology biological process*) getestet (*Fisher exact test*, Benjamini-Hochberg FDR = 0,02). Um zu kontrollieren, ob die Analyse korrekt durchgeführt wurde, wurden die angereicherten *GOBP-terms* nach Prozessen durchsucht, die mit einzelnen Zellzyklusphasen assoziiert waren.

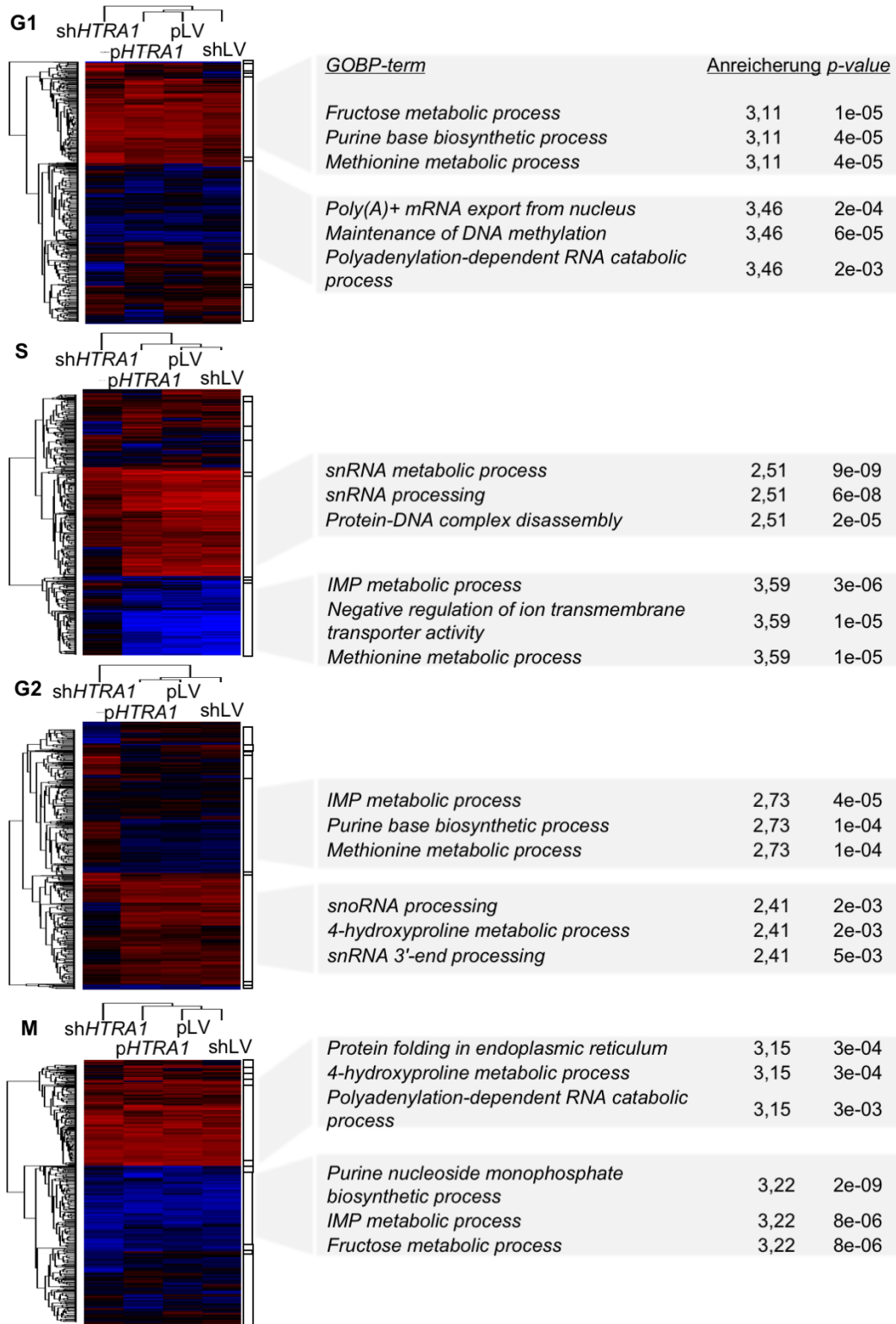


**Abb. 3.28 Analyse des SW480 Proteoms über den Zellzyklus**

**A)** *Heatmap* der hierarchischen Clusteranalyse aller identifizierten Proteine gegen die fünf definierten Zellzyklusphasen nach Z-Transformation. Das Ergebnis ist exemplarisch für die LV Kontrollen gezeigt (für alle *Heatmaps* siehe Abb. 8.6). Die mittlere normalisierte Abundanz der Proteine über alle Proben ist farbig kodiert (rot stärker abundant, blau weniger abundant). Die Proteine wurden nach ihrem Abundanzprofil in fünf Cluster eingeteilt (markiert durch die Balken rechts der *Heatmap*). Die fünf Cluster zeigten eine große Varianz der Abundanz über den Zellzyklus. Die drei am stärksten angereicherten *GOBP-terms* sind für die zwei größten Cluster angegeben (Fisher exact Test, Benjamini-Hochberg FDR 0,02). **B)** Quantifizierung von differentiell abundanten Proteinen in den vier untersuchten SW480 Zelllinien über alle Zellzyklusphasen verglichen mit den asynchronen Kontrollen (zweiseitige t-Tests, FDR = 0,05, S0 = 0,1). Die Abundanz der Proteine im Vergleich zu den Kontrollen ist farbig kodiert (rot stärker abundant, blau weniger abundant). A = Asynchron; AbS = „All but S“

Für die S-Phase Datensätze war in allen Zelllinien der *GOBP-term* „DNA-Replikation“ angereichert (*p-values* zwischen  $1e-09$  und  $2e-04$ ). Alle M-Phase Datensätze zeigten eine Anreicherung von *GOBP-terms*, die mit der Mitose und dem mitotischen Zellzyklus assoziiert waren (*p-values* zwischen  $4e-09$  -  $4e-04$ ). In der hierarchischen Clusteranalyse wurden die Proteine nach ihrem Abundanzprofil in fünf Proteincluster gruppiert. Auch hier wurde für jeden Cluster die Anreicherung von *GOBP-terms* analysiert (Fisher exact test, Benjamini-Hochberg FDR = 0,02). Die drei am stärksten angereicherten *GOBP-terms* für die zwei größten Cluster sind in Abb. 3.28A dargestellt. Die ersten vier Cluster zeigten in allen Zelllinien ähnliche angereicherte *GOBP-terms*. Die Abundanz von Proteinen innerhalb dieser Cluster zeigte jedoch große Unterschiede (Abb. 8.6).

Um diese Unterschiede näher zu untersuchen, wurde erneut eine hierarchische Clusteranalyse der Z-transformierten Daten durchgeführt. Im Gegensatz zur ersten Analyse wurden hier alle identifizierten Proteine gegen die vier SW480 Zelllinien in jeder Zellzyklusphase aufgetragen. Die Proteine wurden nach ihrem Abundanzprofil in zehn Proteincluster gruppiert. Erneut wurde für jeden Cluster die Anreicherung von *GOBP-terms* analysiert (Fisher exact test, Benjamini-Hochberg FDR = 0,02). Die drei am stärksten angereicherten *GOBP-terms* für die zwei größten Cluster sind jeweils in Abb. 3.29 dargestellt. Die Resultate dieser Analyse zeigten, dass große Unterschiede zwischen den vier SW480 Zelllinien bezüglich der Abundanz von Proteinen bestanden. Diese Unterschiede schienen zellzyklusabhängig zu sein, da sie in den einzelnen Phasen unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Am stärksten waren Unterschiede in der S- und G2-Phase zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass HTRA1 innerhalb dieser Zellzyklusphasen eine spezielle Rolle spielt. In der Clusteranalyse wurden *shHTRA1* Zellen immer separat von den drei anderen Zelllinien gruppiert. Das bedeutet, dass sie im Vergleich eine größere Abweichung zu den LV Zelllinien zeigten als *pHTRA1* Zellen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein Verlust von HTRA1 größere Auswirkungen auf das Proteom der SW480 Zellen hatte als eine Überexpression von HTRA1. Eine mögliche Erklärung ist, dass native Level einer Protease ausreichend sind, um die Abundanz der Zielproteine zu modulieren. Eine weitere Erhöhung des Protease-Levels hätte somit eher geringe Auswirkungen.



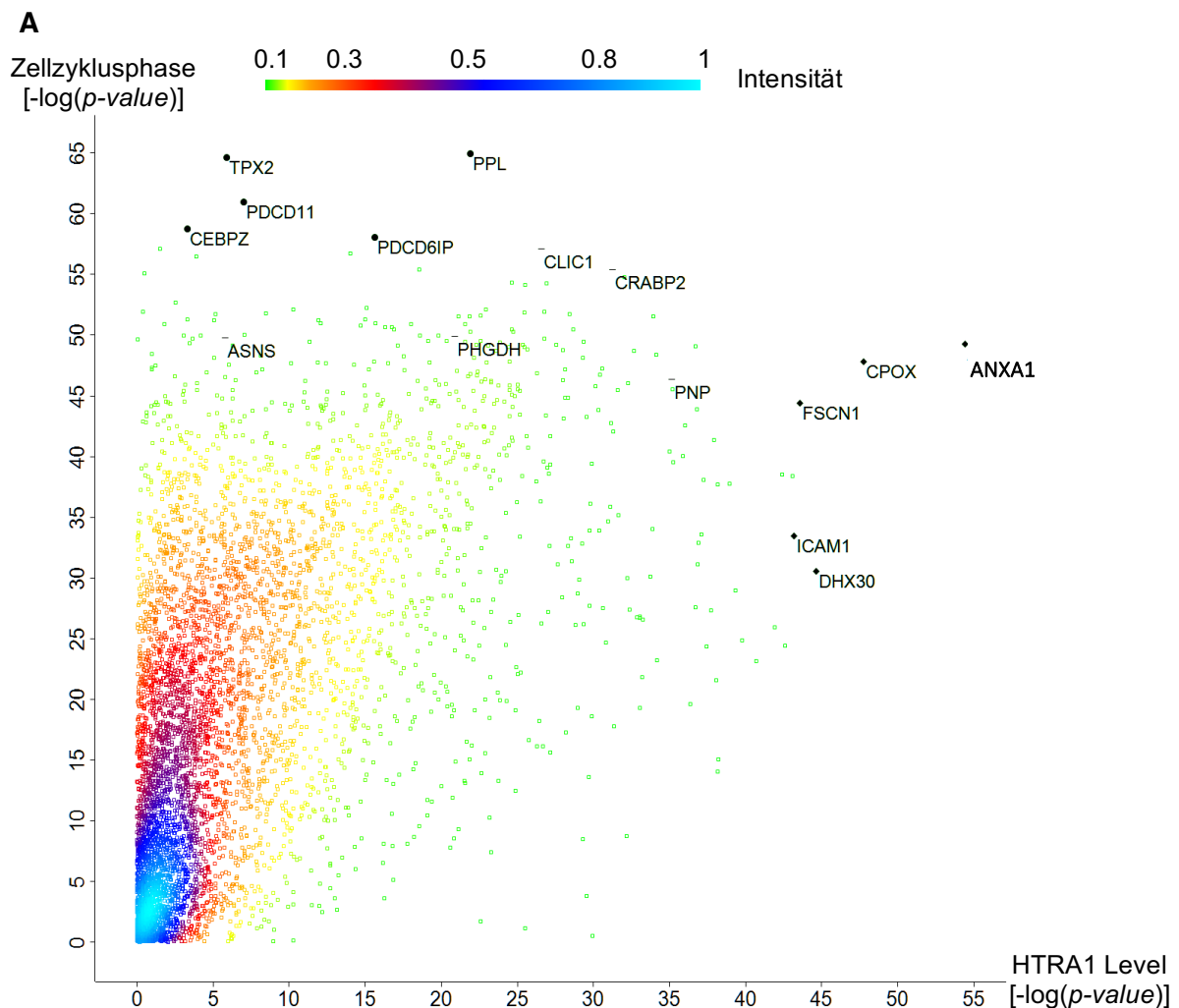
**Abb. 3.29 Variabilität der Protein-Abundanz in Abhängigkeit von HTRA1**

Heatmaps der hierarchischen Clusteranalyse aller identifizierten Proteine gegen die vier SW480 Zelllinien nach Z-Transformation für einzelne Zellzyklusphasen. Die mittlere normalisierte Abundanz der Proteine über alle Proben ist farbig kodiert (rot stärker abundant, blau weniger abundant). Die Proteine wurden nach ihrem Abundanzprofil in zehn Cluster eingeteilt (markiert durch die Balken rechts der Heatmaps). Die drei am stärksten angereicherten GOBP-terms sind jeweils für die zwei größten Cluster angegeben (Fisher exact Test, Benjamini-Hochberg FDR 0,02).

Die Abundanz einzelner Proteine sollte genauer untersucht werden. Deshalb wurde eine zweite statistische Analyse durchgeführt. In einer Varianzanalyse, dem sogenannten Zwei-Wege-ANOVA, wurden die  $\log_2(x)$  LFQ Intensitäten aller Proteine über alle synchronisierten Proben untersucht und so mit den verschiedenen HTRA1 Levels und Zellzyklusphasen in Zusammenhang gebracht. Um nur definierte Zellzyklusphasen zu analysieren, wurden die asynchronen Kontrollen in diesem Test nicht einbezogen. Aus der statistischen Analyse ergaben sich drei Datensätze: Proteinlevel die in Abhängigkeit (i) der Zellzyklusphase, (ii) des HTRA1 Levels und (iii) beider Variablen fluktuierten. Der Übersicht halber werden in den folgenden Abschnitten die Gennamen der identifizierten Proteine verwendet.

(i) 4723 Proteine zeigten signifikante Unterschiede in ihrer Abundanz zwischen den verschiedenen Zellzyklusphasen ( $p\text{-value} < 0.001$ ) (Abb. 3.31). Die Top fünf signifikanten Hits waren PPL, TPX2, PDCD11, CEBPZ und PDCD6IP. Die Top 20 signifikanten Hits sind in Tab. 8.1 zusammengefasst. Im gesamten Datensatz wurden 46 *GOBP-terms* identifiziert, die mit der Regulation oder den Phasen des Zellzyklus assoziiert waren (Tab. 8.4). Diesen 46 *GOBP-terms* waren 867 nicht-redundante Proteine des Datensatzes zugeordnet. Ein Abgleich dieser Proteine mit den 4723 zellzyklusabhängig schwankenden Proteinen ergab, dass 738 Proteine in beiden Datensätzen enthalten waren (85 %). Dies war ein Hinweis auf die korrekte Durchführung von Experiment und Analyse. (ii) Die Abundanz von 2872 Proteinen schwankte in Abhängigkeit des HTRA1 Levels ( $p\text{-value} < 0.001$ ) (Abb. 3.30A). Die Top fünf signifikanten Hits waren ANXA1, CPOX, DHX30, FSCN1 und ICAM1. Die Top 20 signifikanten Hits sind in Tab. 8.2 zusammengefasst. (iii) Die Abundanz von 1530 Proteinen variierte in Abhängigkeit von beidem, der Zellzyklusphase und dem HTRA1 Level ( $p\text{-value} < 0.001$ ) (Abb. 3.30A). Die Top fünf signifikanten Hits waren ASNS, CLIC1, CRABP2, PHGDH und PNP. Die Top 20 signifikanten Hits sind in Tab. 8.3 zusammengefasst. 1510 der 1530 signifikanten Proteine (98,7 %) überlappten mit dem Datensatz der zellzyklusabhängig schwankenden Proteine beschrieben in (i), was auf eine korrekte Implementation der Analyse hindeutete. 1283 der 1530 signifikanten Proteine (84 %) überlappte mit dem Datensatz der HTRA1 abhängig schwankenden Proteine beschrieben in (ii). Diese Analyse zeigte überraschenderweise, dass die Abundanz von 45 % der 2872 Proteine, deren Abundanz in Abhängigkeit von HTRA1 fluktuierte (ii), auch in Abhängigkeit des Zellzyklus schwankte

(1283 von 2872 = 44,7 %). Darüber hinaus waren 263 der 1530 Proteine mit den Zellzyklus-*GOBP-terms* assoziiert (17,2 %). Diese Ergebnisse bedeuteten zusammengefasst, dass ca. die Hälfte der HTRA1 regulierten Proteine zellzyklusabhängig fluktuierte aber nur 17 % der HTRA1 regulierten Proteine wiederum mit dem Zellzyklus assoziiert waren. Zusätzlich zu den drei beschriebenen Datensätzen wurden jene Proteine identifiziert, die nur in Abhängigkeit der Zellzyklusphase oder des HTRA1 Levels fluktuierten. Das *p-value* für die jeweils andere Variable war dabei  $> 0,01$ . Die fünf signifikantesten, ausschließlich zellzyklusabhängig schwankenden, Hits waren DDX27, RRBP1, RRS1, NSA2 und KIF22. Hingegen waren die fünf signifikantesten, ausschließlich HTRA1 abhängig schwankenden, Proteine CD46, LCN2, STRN3, PPA2 und SCARB2.



**Abb. 3.30 Eine globale Analyse der Protein-Abundanz über den gesamten Proteom-Datensatz**  
Dichteplot einer Zwei-Wege-ANOVA statistischen Analyse aller synchronisierten Proben. Die Gennamen der fünf Proteine, deren Abundanz am signifikantesten in Abhängigkeit der Zellzyklusphase (Kreis), des HTRA1 Levels (Raute) oder beider Variablen (Strich) fluktuierte, sind angegeben.



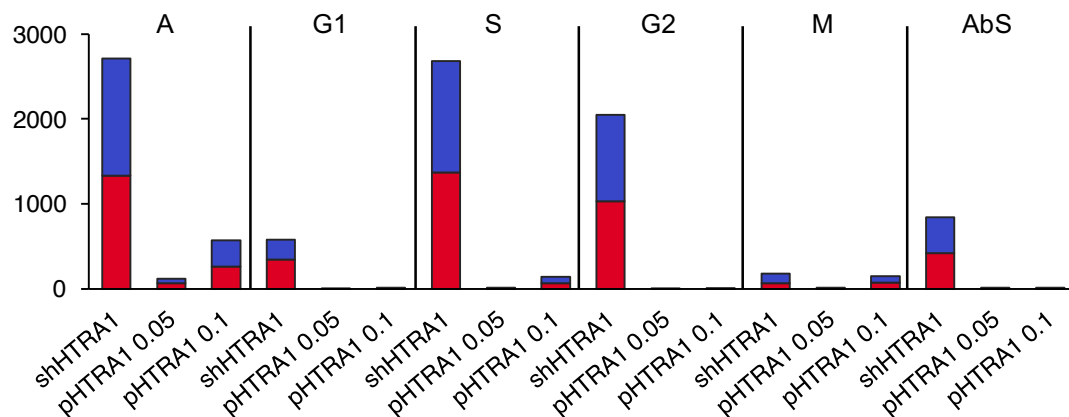
### 3.5.2. Der Effekt eines HTRA1 Verlustes auf das Proteom einzelner Zellzyklusphasen

In der zuvor durchgeführten Varianzanalyse, konnte ein Eindruck darüber gewonnen werden, welche Proteine innerhalb des Datensatzes differentiell abundant waren. Die Analyse gab jedoch keinen Aufschluss darüber, in welchen Bedingungen (Zelllinie und Zellzyklusphase) und auf welche Art (stärker oder weniger abundant) die Proteine differentiell reguliert waren. Im weiteren Verlauf der Analyse sollten deshalb zunächst jene Proteine und Prozesse, die in Abhängigkeit von HTRA1 reguliert wurden, näher untersucht werden. Dazu wurden die Datensätze von *shHTRA1* und *pHTRA1* Zellen in allen Zellzyklusphasen mit den Datensätzen der korrespondierenden Kontrollen (*shLV* und *pLV*) in zweiseitigen t-Tests (FDR = 0,05; S0 = 0,1) verglichen. Als Kontrolle wurden *shLV* und *pLV* Zellen gegeneinander getestet und zeigten nur sehr geringe Unterschiede (3 signifikante Hits: SPATA31A7, SYNGR2 und VIL1). Diese Proteine wurden als falsch-positiv aus der Analyse ausgeschlossen.

Die Anzahl an signifikant differentiell abundanten Proteinen in *shHTRA1* Zellen war mehr als 20-fach größer als in *pHTRA1* Zellen (Abb. 3.31). Dieses Ergebnis bestätigte die Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalyse (Abb. 3.29), die auf eine stärkere Auswirkung eines HTRA1 Verlustes als einer HTRA1 Überexpression hindeuteten. Da die Anzahl differentiell regulierter Proteine in *pHTRA1* Zellen sehr gering war, wurden die zweiseitigen t-Tests noch einmal mit einer größeren FDR (0,1) wiederholt, um keine wichtigen Hits zu verlieren. Die größten Unterschiede im Proteom zwischen *shHTRA1* Zellen verglichen mit *shLV* Zellen wurden erneut in der S-Phase (2681 differentiell regulierte Proteine) und der G2-Phase (2049 differentiell regulierte Proteine) beobachtet (Abb. 3.31). G1-Phase (578 differentiell regulierte Proteine) und M-Phase (175 differentiell regulierte Proteine) zeigten im Vergleich weniger Unterschiede zwischen *shHTRA1* und *shLV* Zellen. Im Gegensatz dazu waren die größten Unterschiede zwischen *pHTRA1* und *pLV* Zellen in der M-Phase (150 differentiell regulierte Proteine) und S-Phase (140 differentiell regulierte Proteine) zu beobachten (Abb. 3.31). In G1-Phase (10 differentiell regulierte Proteine) und G2-Phase (1 differentiell reguliertes Protein = HTRA1) konnten kaum Unterschiede zwischen *pHTRA1* und *pLV* Zellen detektiert werden.

**C**

Differentiell abundante Proteine  
(verglichen mit LV Kontrollen)



**Abb. 3.31 Signifikant differentiell abundante Proteine in Abhängigkeit von HTRA1**

Gezeigt sind die in shHTRA1 (zweiseitige t-Tests, FDR = 0,05, S0 = 0,1) und pHTRA1 (zweiseitige t-Tests, FDR = 0,05 und 0,1, S0 = 0,1) Zellen signifikant differentiell abundanten Proteine im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollen (shLV und pLV) über alle Zellzyklusphasen. Die Abundanz der Proteine im Vergleich zu den Kontrollen ist farbig kodiert (rot stärker abundant, blau weniger abundant). A = Asynchron; AbS = „All but S“

### 3.5.3. Die Level von 62 Proteinen korrelierten invers mit dem HTRA1 Level

Unterschiede in der Abundanz von Proteinen, die mit dem HTRA1 Level korrelieren, können durch direkte oder indirekte Effekte erzeugt werden. Direkte Effekte beinhalten die Bindung an und/oder den proteolytischen Abbau durch HTRA1. Indirekte Effekte können durch verschiedene Ereignisse verursacht werden. Beispielsweise können Substrate, die von HTRA1 proteolysiert werden, die Abundanz anderer Proteine durch regulatorische Mechanismen beeinflussen. Es können auch Veränderungen durch die Adaptation der Zellen auf genetische Manipulationen wie z.B. die lentivirale Transduktion der SW480 Zellen entstehen. Theoretisch sollten aber die Level von HTRA1 Substraten invers mit dem HTRA1 Level korrelieren. In asynchronen shHTRA1 Zellen waren 1328 Proteine signifikant stärker abundant als in shLV Zellen (zweiseitiger t-Test FDR = 0,05; S0 = 0,1) (Tab. 3.1). Für die signifikanten Hits wurde der  $\log_2$  „fold change“ ( $\log_2(\text{fc})$ ) berechnet. Dabei handelt es sich um das logarithmierte (Basis 2) normalisierte Proteinlevel als Vielfaches der LV Kontrolle. Der Übersicht halber sind  $\log_2(\text{fc})$  und *p-value* für die einzelnen Proteine nur in den entsprechenden Tabellen aufgeführt. Die Top fünf Proteine mit dem größten  $\log_2(\text{fc})$  waren DPYSL3, GDA, PDIA3, STXBP6 und F13A1.

**Tab. 3.1 Liste der Top 20 in asynchronen shHTRA1 Zellen stärker abundanten Proteine verglichen mit der shLV Kontrolle**

Dargestellt sind die Ergebnisse eines zweiseitigen t-Tests (FDR = 0,05; S0 = 0,1) absteigend sortiert nach dem  $\log_2(x)$  fold change ( $\log_2(fc)$ ).

Protein	Gen	$\log_2(fc)$	p-value
Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYSL3	5,99	5e-08
Guanine deaminase	GDA	4,22	1e-05
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	4,20	3e-02
Syntaxin-binding protein 6	STXBP6	3,63	8e-04
Coagulation factor XIII A chain	F13A1	3,48	1e-04
15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase	HPGD	3,23	1e-07
Nucleoside diphosphate kinase 7	NME7	3,05	8e-02
Claspin	CLSPN	3,03	1e-03
26S protease regulatory subunit 6A	PSMC3	2,99	5e-03
Tropomyosin 1 (Alpha) isoform CRA_f	TPM1	2,98	1e-02
Annexin A1	ANXA1	2,96	6e-07
PMS1 protein homolog 1	PMS1	2,87	6e-04
Prelamin-A/C	LMNA	2,65	1e-02
E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1	LRSAM1	2,65	1e-02
Caveolin-1	CAV1	2,53	9e-03
Influenza virus NS1A-binding protein	IVNS1ABP	2,51	2e-03
Phosphotriesterase-related protein	PTER	2,49	9e-02
HCLS1-binding protein 3	HS1BP3	2,48	3e-03
Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	NUCKS1	2,46	3e-03
Putative glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 2	CHAC2	2,44	2e-02

Des Weiteren konnten unter den 1328 Proteinen auch bereits bekannte HTRA1 Substrate wie z.B. 12 Tubulin Isoformen identifiziert werden (TUBA1A, TUBA4A, TUBA1B, TUBA1C, TUBB, TUBB2B, TUBB3, TUBB4A, TUBB4B, TUBB6, TUBB8, TUBGCP2) (Chien *et al.*, 2009). In asynchronen pHTRA1 Zellen waren 307 Proteine signifikant weniger abundant als in pLV Zellen (zweiseitiger t-Test FDR = 0,1; S0 = 0,1) (Tab. 3.2). Die Top fünf reduzierten Proteine waren RPL39P5, PDIA3, PDPK1, MRPS12 und HERC2. Um eine Liste von möglichen HTRA1 Substraten zu generieren, wurden die signifikant stärker abundanten Proteine in shHTRA1 mit den signifikant weniger abundanten Proteinen in pHTRA1 abgeglichen<sup>9</sup>. Daraus entstand ein Datensatz von 62 Proteinen, die signifikant invers mit dem HTRA1 Level in SW480 Zellen korrelierten. 30 dieser 62 Proteine hatte einen  $\log_2(fc) >$  bzw.  $< 1$  (Tab. 3.3). 17 der 62 invers korrelierenden Proteine (27,4 %) waren mit den zuvor beschriebenen Zellzyklus-GOBP-terms assoziiert: AKT2, CDK5, CDK6, CRLF3, DYNLT1, ECD GAK, GSPT1, HAUS1, HSPA2, KIAA0101, KNSTRN, LMNA, MAP2K1, PSMC3, TPD52L1

<sup>9</sup> Der Abgleich von Datensätzen erfolgte hier und im Folgenden durch Verwendung eines Skriptes geschrieben von Dr. Kenny Bravo Rodriguez (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland)

und ZAK. Die Proteine des ERK-Signalweges zeigten keine signifikant höhere oder verminderte Abundanz mit einem  $\log_2(\text{fc}) > \text{bzw.} < 1$ . B-RAF und C-RAF konnten im Rahmen dieser Proteomanalyse nicht analysiert werden, da die Proteine in keiner der 96 LC-MS Messungen identifiziert werden konnte.

Die 62 invers korrelierenden Proteine wurden zusätzlich auf andere signifikant angereicherten *GOBP-terms* untersucht (*GORilla online tool*, *p-value* 0,001) (2.1.11, Tab. 8.5). Zusammengefasst waren Prozesse, die das Mikrotubuli-Zytoskelett betrafen, wie z.B. „*microtubule cytoskeleton organization*“ (Anreicherung 22737, *p-value* 7e-04) und „*post-chaperonin tubulin folding pathway*“ (Anreicherung 47, *p-value* 7e-04), sowie der „*cellular developmental process*“ (Anreicherung 45323, *p-value* 9e-04) und mehrere metabolische sowie biosynthetische Prozesse angereichert. Dass in diesem Datensatz Proteine aus Mikrotubuli-assoziierten Prozessen angereichert

**Tab. 3.2 Liste der Top 20 in asynchronen *pHTRA1* Zellen weniger abundanten Proteine verglichen mit der pLV Kontrolle**

Dargestellt sind die Ergebnisse eines zweiseitigen t-Tests (FDR = 0,1; S0 = 0,1) aufsteigend sortiert nach dem  $\log_2(x)$  *fold change* ( $\log_2(\text{fc})$ ).

Protein	Gen	$\log_2(\text{fc})$	<i>p-value</i>
Putative 60S ribosomal protein L39-like 5	RPL39P5	-5,68	3e-06
Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment)	PDIA3	-4,54	4e-02
3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1	PDPK1	-3,91	4e-05
28S ribosomal protein S12, mitochondrial	MRPS12	-3,27	2e-02
E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	HERC2	-3,26	6e-02
Band 4,1-like protein 1	EPB41L1	-3,23	2e-02
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex assembly factor 3	UQCC3	-2,78	4e-02
Histone lysine demethylase PHF8	PHF8	-2,74	2e-04
Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	CREB1	-2,71	8e-03
Prelamin-A/C	LMNA	-2,64	5e-03
Sphingolipid delta(4)-desaturase DES1	DEGS1	-2,57	2e-03
39S ribosomal protein L20, mitochondrial	MRPL20	-2,56	2e-02
BCL-6 corepressor-like protein 1 (Fragment)	BCORL1	-2,55	6e-04
Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3	CAMSAP3	-2,43	9e-03
Cytochrome c oxidase assembly protein COX19	COX19	-2,31	2e-02
PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	-2,29	1e-02
Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	-2,23	3e-04
Protein SON (Fragment)	SON	-2,20	3e-03
Caspase recruitment domain-containing protein 19	C9orf89	-2,17	6e-02
Coiled-coil domain-containing protein 43	CCDC43	-2,14	1e-02

**Tab. 3.3 Die Level von 30 Proteinen korrelierten invers mit der Abundanz von HTRA1 mit einem  $\log_2(x)$  fold change > oder < 1**

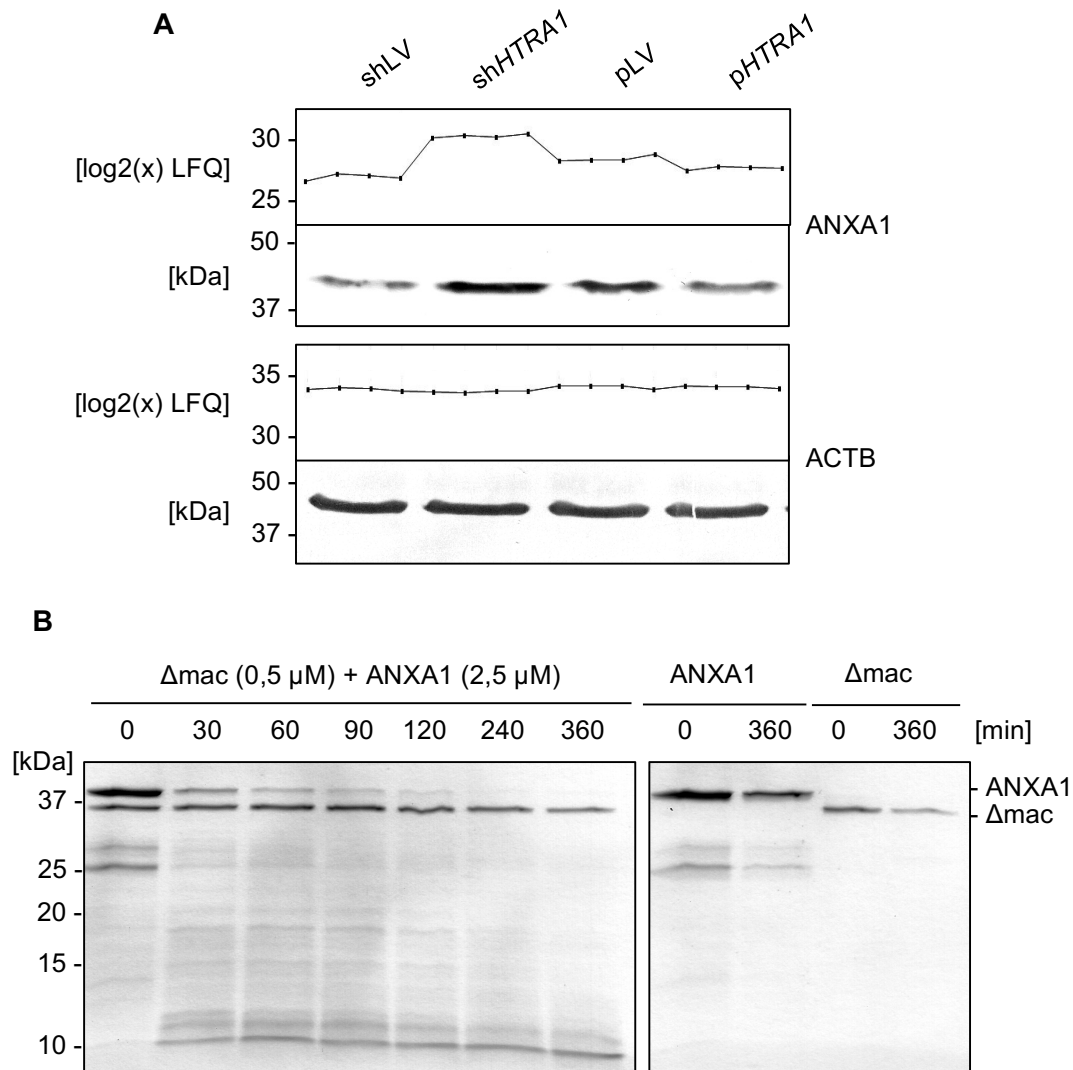
Dargestellt sind die Ergebnisse zweiseitiger t-Tests asynchroner shHTRA1 Zellen und der shLV Kontrolle (FDR = 0,05; S0 = 0,1), sowie asynchroner pHTRA1 Zellen und der pLV Kontrolle (FDR = 0,1; S0 = 0,1). Die Proteine sind in alphabetischer Reihenfolge der Gennamen angegeben. Der  $\log_2(x)$  fold change ( $\log_2(fc)$ ) und das *p-value* sind für beide Zelllinien gezeigt. Proteine die mit dem Zellzyklus (grün) oder Apoptose (blau) oder beidem (orange) assoziiert sind, sind farblich markiert.

Protein	Gen	$\log_2(fc)$ shHTRA1	$\log_2(fc)$ pHTRA1	<i>p-value</i> shHTRA1	<i>p-value</i> pHTRA1
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	1,1	-1,1	2e-02	2e-02
Annexin A1	ANXA1	3,0	-0,7	6e-07	1e-03
Uncharacterized protein C1orf122	C1orf122	0,6	-1,3	2e-02	4e-03
Cyclin-dependent kinase 6	CDK6	1,9	-0,7	1e-04	1e-02
Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	0,6	-2,2	6e-03	3e-04
Cytokine receptor-like factor 3	CRLF3	1,1	-1,3	4e-03	2e-02
Deoxycytidylate deaminase	DCTD	1,7	-0,8	3e-04	3e-02
Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYSL3	6,0	-1,9	5e-08	1e-04
Dynein light chain Tctex-type 1	DYNLT1	0,6	-1,0	1e-02	9e-03
HAUS augmin-like complex subunit 1	HAUS1	0,6	-1,6	1e-02	5e-02
PCNA-associated factor	KIAA0101	1,1	-1,3	6e-05	2e-03
Prelamin-A/C	LMNA	2,7	-2,6	1e-02	5e-03
Acyl-protein thioesterase 2	LYPLA2	1,0	-0,5	9e-04	7e-03
Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1	MALT1	1,3	-0,7	4e-04	3e-03
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	1,3	-0,7	2e-02	3e-04
Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	0,7	-1,8	3e-03	2e-02
Nucleoside diphosphate kinase 7	NME7	3,0	-2,0	8e-02	7e-02
Protein FAN	NSMAF	1,4	-1,0	2e-02	1e-02
5(3)-deoxyribonucleotidase	NT5C	1,1	-0,6	3e-04	8e-03
Protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	4,2	-4,5	3e-02	4e-02
26S protease regulatory subunit 6A	PSMC3	0,4	-2,0	3e-05	6e-02
Ribose-5-phosphate isomerase	RPIA	1,4	-0,4	7e-05	4e-04
Putative 60S ribosomal protein L39-like 5	RPL39P5	0,6	-5,7	5e-02	3e-06
Succinate dehydrogenase assembly factor 2	SDHAF2	0,3	-1,1	2e-02	1e-02
Tubulin-specific chaperone D	TBCD	1,1	-0,6	7e-05	1e-02
Tubulin-specific chaperone E	TBCE	1,5	-0,7	6e-05	1e-02
Tumor protein D53	TPD52L1	1,3	-1,5	2e-03	6e-03
Trafficking protein particle complex subunit 2-like protein	TRAPPC2L	1,1	-1,0	1e-02	4e-02
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UBE2V2	1,2	-1,9	5e-04	2e-02
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLT	ZAK	0,4	-1,0	3e-02	3e-02

waren, passt zu Tubulin als bekanntes HTRA1 Substrat. Dabei wurden Tubulin-spezifische Chaperone (TBCD und TBCE), sowie Teile des Dynactin/Dynein Proteinkomplexes (DCTN5 und DNLT1) als potentielle HTRA1 Substrate identifiziert. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von HTRA1 an der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts und dem Mikrotubuli basiertem Transport hin. Darüber hinaus waren auch die *GOBP-terms* „*regulation of apoptotic process*“ (Anreicherung 20121, *p-value* 8e-04) und „*regulation of programmed cell death*“ (Anreicherung 18660, *p-value* 9e-04) mit 14 der 62 Proteine assoziiert (22,5 %), was auf eine Rolle von HTRA1 in reguliertem Zelltod hindeutet. Diese Proteine waren ANXA1, CBL, CDK5, ERC1, LMNA, MALT1, NME1, NSMAF, PDIA3, PPID, TPD52L1, TPT1, UBE2V2 und ZAK.

#### **3.5.4. Die Interaktion von HTRA1 und Annexin A1**

Das Protein ANXA1 (Annexin A1) war bereits in der Zwei-Wege-ANOVA statistischen Analyse als das, am signifikantesten HTRA1 regulierte, Protein identifiziert worden (Abb. 3.30). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden Zelllysate asynchroner SW480 Zellen (2.3.5) mittels Western Blot-Analyse und Immundetektion (2.4.8) untersucht. Hierzu wurde ein Antikörper gegen das Annexin A1 Protein (ANXA1) verwendet. Aktin diente als Ladekontrolle (ACTB). Das Ergebnis der Western Blot-Analyse deutete darauf hin, dass Annexin A1 in sh*HTRA1* Zellen stärker abundant war als in den anderen Zelllinien (Abb. 3.32A). Diese Resultate stimmten auch mit den log<sub>2</sub>(LFQ) Intensitäten der asynchronen Proben des Proteom Datensatzes überein (Abb. 3.32A). Um zu überprüfen, ob Annexin A1 ein Substrat von HTRA1 ist, wurde rekombinantes Annexin A1 (Tab. 2.13) mit HTRA1Δ<sub>mac</sub> in einem Verhältnis von 1:5 (0,5 μM:2,5 μM) für 360 min bei 37 °C in Phosphat-Puffer inkubiert (2.4.12). Nach 0, 30, 60, 90, 120, 240 und 360 min wurden Proben entnommen und die Proteolyse anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (2.4.5, 2.4.6) analysiert. Annexin A1 alleine war unter den gewählten Bedingungen über 360 min stabil (Abb. 3.32B). Ein Abbau von Annexin A1 in Anwesenheit von HTRA1Δ<sub>mac</sub> war bereits nach 30 min zu beobachten. Nach 240 min war die Annexin A1 Bande bei 41 kDa nicht mehr detektierbar. Im Verlauf der Proteolyse entstanden mehrere Banden kleinerer Größe, die vermutlich den Abbauprodukten von Annexin A1 entsprachen. Auch diese Banden waren nach 360 min kaum noch detektierbar. Annexin A1 konnte somit als bisher unbekanntes HTRA1 Substrat identifiziert werden.



**Abb. 3.32 Abundanz und Stabilität von Annexin A1 in Abhängigkeit von HTRA1**

**A)** Annexin A1 (ANXA1) Level in asynchronen SW480 Zellen. Gezeigt sind die logarithmierten LFQ Intensitäten ( $\log_2(\text{LFQ})$ ) der Proteom-Analyse und die Ergebnisse einer Western Blot-Analyse aus SW480 Zelllysaten mit anschließender Immundetektion (2.4.8). Actin (ACTB) diente als Kontrolle.

**B)** Proteolyse von Annexin A1 (ANXA1, 2,5  $\mu\text{M}$ ) durch HTRA1 $\Delta\text{mac}$  (0,5  $\mu\text{M}$ ) (2.4.11). Proben wurden nach 0, 30, 60, 90, 120, 240 und 360 min entnommen und mittels SDS-PAGE (2.4.5) mit anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) analysiert.

### 3.5.5. Die Level von 46 Proteinen korrelierten direkt mit dem HTRA1 Level

HtrA Proteasen sind in der Lage, Proteine zu binden ohne diese proteolytisch abzubauen (Spiess *et al.*, 1999, Krojer *et al.*, 2008, Malet *et al.*, 2012). Eine solche Bindung könnte die HTRA1 Liganden vor dem proteolytischen Abbau durch andere Proteasen schützen. Die Abundanz potentieller Liganden müsste also theoretisch direkt mit dem Level von HTRA1 korrelieren, d.h. abnehmen in Abwesenheit von HTRA1 und zunehmen bei HTRA1 Überexpression.

**Tab. 3.4 Liste der Top 20 in asynchronen shHTRA1 Zellen schwächer abundanten Proteine verglichen mit der shLV Kontrolle**

Dargestellt sind die Ergebnisse eines zweiseitigen t-Tests (FDR = 0,05; S0 = 0,1) aufsteigend sortiert nach dem  $\log_2(x)$  fold change ( $\log_2(fc)$ ).

Protein	Gen	$\log_2(fc)$	p-value
Microtubule-actin cross-linking factor 1	MACF1	-6,73	1e-06
Transketolase-like protein 1	TKTL1	-3,83	3e-04
F-BAR domain only protein 2	FCHO2	-3,68	1e-02
Trichohyalin	TCHH	-3,65	8e-02
ER membrane protein complex subunit 4	EMC4	-3,45	4e-06
Protein EMSY	EMSY	-3,40	2e-04
Cytochrome c oxidase copper chaperone	COX17	-3,29	7e-02
Melanotransferrin	MFI2	-3,29	1e-05
Membrane cofactor protein	CD46	-2,99	8e-03
Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	-2,69	3e-07
Phospholipase D1	PLD1	-2,68	5e-03
Cadherin-1	CDH1	-2,65	2e-05
Histone deacetylase 6	HDAC6	-2,64	2e-04
Histone H1,0	H1F0	-2,63	1e-01
Poly(A) polymerase gamma	PAPOLG	-2,43	2e-04
ORM1-like protein 2	ORMDL2	-2,37	6e-02
Tumor-associated calcium signal transducer 2	TACSTD2	-2,33	2e-04
Tumor suppressor ARF	CDKN2A	-2,32	4e-02
Intercellular adhesion molecule 2	ICAM2	-2,29	9e-03
Protein NEDD8-MDP1	NEDD8-MDP1	-2,25	7e-02

**Tab. 3.5 Liste der Top 20 in asynchronen pHTRA1 Zellen stärker abundanten Proteine verglichen mit der pLV Kontrolle**

Dargestellt sind die Ergebnisse eines zweiseitigen t-Tests (FDR = 0,1; S0 = 0,1) absteigend sortiert nach dem  $\log_2(x)$  fold change ( $\log_2(fc)$ ).

Protein	Gen	$\log_2(fc)$	p-value
Serine protease HTRA1	HTRA1	6,61	9e-08
Microtubule-actin cross-linking factor 1	MACF1	5,56	1e-02
OTU domain-containing protein 5	OTUD5	4,10	3e-04
Transcription elongation factor SPT4	SUPT4H1	4,10	3e-07
Atlastin-3	ATL3	3,52	2e-02
Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2	NUDT4	3,44	5e-04
Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	3,27	1e-02
Protein CLEC16A	CLEC16A	3,19	6e-03
Forkhead box protein M1	FOXM1	3,18	9e-03
ORM1-like protein 3	ORMDL3	2,96	1e-03
Vesicle-associated membrane protein 2	VAMP2	2,95	2e-04
Pyruvate kinase	PKM	2,93	3e-03
RING-box protein 2	RNF7	2,75	3e-05
Tax1-binding protein 1	TAX1BP1	2,64	5e-02
LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 3	LIMS1	2,63	2e-02
Cyclin-Y-like protein 1	CCNYL1	2,57	4e-05
DnaJ homolog subfamily C member 5	DNAJC5	2,56	3e-02
Transmembrane protein 256	TMEM256	2,49	2e-02
ADP-ribosylation factor-like protein 8A	ARL8A	2,41	8e-03
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7	CHD7	2,41	6e-04



In asynchronen *shHTRA1* Zellen wurden 1382 Proteine identifiziert, deren Abundanz im Vergleich zu *shLV* Zellen signifikant geringer war (zweiseitiger t-Test FDR = 0,05;  $S_0 = 0,1$ ) (Tab. 3.4). Die Top fünf am stärksten reduzierten Proteine waren MACF1, TKTL1, FCHO2, TCHH und EMC4. Umgekehrt wurden 262 Proteine als signifikant stärker abundant in *pHTRA1* Zellen verglichen mit der *pLV* Kontrolle identifiziert (zweiseitiger t-Test FDR = 0,1;  $S_0 = 0,1$ ) (Tab. 3.5). Die Top fünf signifikanten Hits waren, neben HTRA1 selbst, MACF-1, OTUD5, SUPT4H1, ATL3 und NUDT4. Ein Abgleich beider Datensätze ergab eine Übereinstimmung von 46 Proteinen. 18 der 46 Proteine zeigten einen  $\log_2(\text{fc}) > \text{bzw.} < 1$  (Tab. 3.6). 2 der 46 Proteine waren mit den zuvor erwähnten Zellzyklus-*GOBP-terms* assoziiert (BARD1 und MACF1). Eine zusätzliche Untersuchung auf signifikant angereicherte *GOBP-terms* in diesem Datensatz (*GORilla online tool*, *p-value* 0,001) lieferte keine signifikanten Ergebnisse.

**Tab. 3.6 Die Level von 18 Proteinen korrelieren direkt mit der Abundanz von HTRA1 mit einem  $\log_2(\text{x})$  fold change > oder < 1**

Dargestellt sind die Ergebnisse zweiseitiger t-Tests asynchroner *shHTRA1* Zellen gegen die *shLV* Kontrolle (FDR = 0,05;  $S_0 = 0,1$ ) und asynchroner *pHTRA1* Zellen gegen die *pLV* Kontrolle (FDR = 0,1;  $S_0 = 0,1$ ). Die Proteine sind in alphabetischer Reihenfolge der Gennamen angegeben. Der  $\log_2(\text{x})$  fold change ( $\log_2(\text{fc})$ ) und das *p-value* sind für beide Zelllinien angegeben. Proteine die mit dem Zellzyklus assoziiert sind, sind farblich markiert (grün).

Protein	Gen	$\log_2(\text{fc})$ <i>shHTRA1</i>	$\log_2(\text{fc})$ <i>pHTRA1</i>	<i>p-value</i> <i>shHTRA1</i>	<i>p-value</i> <i>pHTRA1</i>
AP2-associated protein kinase 1	AAK1	-1,2	1,3	6e-2	3e-2
Atlastin-3	ATL3	-0,6	3,5	1e-4	2e-2
ATP synthase subunit delta, mitochondrial	ATP5D	-0,5	0,7	2e-2	4e-3
MICOS complex subunit MIC25	CHCHD6	-1,0	0,6	3e-3	3e-5
Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	-1,2	0,4	1e-4	7e-3
IgG receptor FcRn large subunit p51	FCGRT	-1,1	0,6	3e-3	2e-2
Fibronectin type III domain-containing protein 3B	FNDC3B	-0,9	0,6	8e-3	3e-2
Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	GNAQ	-1,2	0,6	5e-2	2e-2
Histidine triad nucleotide-binding protein 3	HINT3	-1,4	1,4	4e-3	6e-2
MICOS complex subunit MIC60	IMMT	-0,4	1,6	1e-4	1e-2
Microtubule-actin cross-linking factor 1	MACF1	-0,3	5,6	2e-4	1e-2
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 31	MED31	-1,2	1,3	9e-3	4e-2
Macrophage-stimulating protein receptor	MST1R	-1,5	0,5	5e-7	3e-3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	NDUFA11	-1,4	0,8	2e-5	5e-3
Presenilins-associated rhomboid-like protein, mitochondrial	PARL	-1,0	1,2	5e-2	3e-3
Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 3	SIPA1L3	-0,8	2,1	1e-1	6e-3
Smad nuclear-interacting protein 1	SNIP1	-2,1	1,7	3e-2	3e-2
Trimeric intracellular cation channel type B	TMEM38B	-0,7	1,5	3e-2	2e-2

### 3.5.6. Differenziell regulierte HTRA1 Interaktoren

In einem PD Experiment mit HTRA1 $\Delta$ mac und HTRA1 $\Delta$ PDZ aus HeLa Zelllysaten und anschließender LC-MS wurden potentielle HTRA1 Interaktoren identifiziert<sup>10</sup>. Die Daten aus den PD Experimenten wurden im Rahmen dieser Arbeit wie zuvor beschrieben (3.5.1) mit der Perseus Software gefiltert und ausgewertet. Dabei wurde C-RAF als HTRA1 bindendes Protein identifiziert. Im PD mit HTRA1 $\Delta$ mac war C-RAF signifikant gegenüber der *Bead* Kontrolle angereichert ( $\log_2(\text{fc})$  2, *p-value* 0,007). Im PD mit HTRA1 $\Delta$ PDZ konnte keine signifikante Anreicherung festgestellt werden. Wie in den vorherigen Experimenten (3.3.1) war die Bindung von C-RAF an HTRA1 abhängig von der PDZ Domäne.

Darüber hinaus wurden die Daten der PD Experimente mit den Datensätzen der invers und direkt HTRA1 korrelierenden Proteinen verglichen. Der Abgleich der PD Experimente mit den HTRA1-invers korrelierenden Proteinen ergab als einzige Überschneidung beider Datensätze das Protein MAP7D1 (*MAP7 domain-containing protein*), welches mit dem *GOBP-term* „*microtubule cytoskeleton organization*“ assoziiert war. Da dieses Protein sowohl an HTRA1 bindet als auch invers mit den Leveln von HTRA1 korreliert, kommt MAP7D1 als bisher unbekanntes HTRA1 Substrat in Frage. Diese Theorie wurde weiterhin dadurch unterstützt, dass die 4 C-terminalen Aminosäuren von MAP7D1 ein PDZ-Bindemotif darstellen (TEVL) (Runyon *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse deuten erneut auf eine Rolle von HTRA1 in der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts hin.

Anschließend wurden die experimentellen Daten der PD Experimente mit den HTRA1-direkt korrelierenden Proteinen abgeglichen. Beide Datensätze stimmten in drei Proteinen überein: HNRNPF (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F*), MRPL23 (*39S ribosomal protein L23*) und SHCBP1 (*SHC SH2 domain-binding protein 1*). Während HNRNPF und MRPL23 mit *GOBP-terms* assoziiert waren, die die RNA-Prozessierung und Translation betrafen, spielte SHCBP1 eine Rolle in der Zellproliferation und zellulären Signalwegen.

---

<sup>10</sup> Die *Pulldown* Experimente wurden von Katharina Severin durchgeführt (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland). Die Messung der Proben mittels LC-MS und Identifikation der Peptide mit der MaxQuant Software erfolgte durch Dr. Farnusch Kaschani (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland). Die Auswertung der *Pulldown* Experimente sowie der Abgleich der Ergebnisse mit dem Proteom-Datensatz erfolgte mit Erlaubnis von Katharina Severin.

Zusätzlich wurden jene Proteine, die in shHTRA1 Zellen stärker abundant waren als in shLV Zellen, mit den Ergebnissen der PD Experimenten verglichen. Ein Abgleich beider Datensätze ergab eine Übereinstimmung von 106 Proteinen aus dem PD mit HTRA1Δmac und 86 Proteinen aus dem PD mit HTRA1ΔPDZ. Diese beiden Datensätze wiederum stimmten in 81 Proteinen überein. Daraus lässt sich schließen, dass von den 106 möglichen Interaktionspartnern von HTRA1, bei 25 die Interaktion PDZ abhängig war. Ein Abgleich mit den Zellzyklus-GOBP-terms ergab, dass 15 der 81 PDZ unabhängigen Interaktoren und 8 der 15 potenziellen PDZ Liganden mit dem Zellzyklus assoziiert waren. Um erneut einen Überblick über potentielle Funktionen von HTRA1 in der Regulation des Zellzyklus zu erhalten, wurden diese Proteine nach prominenten Zellzyklus relevanten Prozessen in Gruppen unterteilt (Tab. 3.7). In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen dieser Arbeit, war die Organisation des Zytoskeletts, speziell die Assemblierung der mitotischen Spindel, ein prominenter biologischer Prozess unter den identifizierten Proteinen. So wurden neben den bereits erwähnten Tubulin Isoformen auch BRE (Yan *et al.*, 2015), CDK1 (Medema und Macurek 2011), NUSAP1 (Raemaekers *et al.*, 2003), CDC42 (Oceguera-Yanez *et al.*, 2005) und SEPT2 (Spiliotis *et al.*, 2005) identifiziert. Diese Proteine sind an der korrekten Assemblierung und/oder Bindung der mitotischen Spindel an Kinetochore beteiligt. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass HTRA1 eine Rolle in der Assemblierung der mitotischen Spindel und/oder in der Bindung der Spindel an Kinetochore spielt. Des Weiteren waren folgende identifizierte Proteine mit der G2/M-Phase Transition assoziiert: CDK1 (Draetta und Beach 1988), RPS27A/UBA52 (Wang *et al.*, 2014, Kobayashi *et al.*, 2016) und SKP1 (Burrows *et al.*, 2012). Diese Daten legen nahe, dass HTRA1 zusätzlich die Initiation der Mitose am Ende der G2-Phase beeinflussen könnte. BRE (Feng *et al.*, 2009) und CDK1 (Medema und Macurek 2011) sind außerdem assoziiert mit dem G2 DNA-damage Checkpoint. Insgesamt verursachte ein Verlust von HTRA1 also Veränderungen in der Abundanz von Proteinen die eine wichtige regulatorische Rolle in der G2- und M-Phase des Zellzyklus spielen.

Auch an dieser Stelle war die Betrachtung von Proteinen wichtig, die von HTRA1 gebunden aber nicht proteolysiert und so vor der Proteolyse vor anderen Proteasen geschützt werden könnten (Krojer *et al.*, 2008). Um solche HTRA1 Liganden zu identifizieren, wurden die Ergebnisse der PD Experimente mit Proteinen verglichen,

**Tab. 3.7 Liste potentieller, Zellzyklus assoziierter HTRA1 Substrate**

Gezeigt ist eine Liste von Proteinen, deren Abundanz in shHTRA1 Zellen signifikant stärker war als in der shLV Kontrolle (Tab. 3.1) und die gleichzeitig im PD Experiment mit HTRA1Δmac und/oder HTRA1ΔPDZ identifiziert wurden. Außerdem waren diese Proteine mit Zellzyklus relevanten Prozessen assoziiert. Die Proteine wurden nach biologischen Prozessen gruppiert. Proteine mit einem Stern konnten durch die identifizierten Peptide nicht eindeutig unterschieden werden.

Biologischer Prozess	Bindet an HTRA1Δmac und HTRA1ΔPDZ	Bindet ausschließlich an HTRA1Δmac
<b>G1-S Transition</b>	PPP6C, SKP1	CDK1
<b>DNA-Doppelstrangbruch Reparatur</b>	BRE	TRIP13
<b>Protein De-/Ubiquitinierung; Degradation ubiquitiniertes Proteine</b>	BRE, CDC23, GNB2L1, SKP1, RPS27A/UBA52/UBB/UBC*, USP9X	CDC42, CDK1, PSMC5
<b>G2-DNA damage checkpoint</b>	BRE	CDK1
<b>G2-M Transition</b>	RPS27A/UBA52*, SKP1	CDK1, PSMC5
<b>Assemblierung der mitotischen Spindel; Bindung der Spindel an das Kinetochor; M-Phase Transition</b>	CDC23, NUSAP1, TUBA1B, TUBA1C, TUBA4A, TUBB, TUBB3, TUBB4B	CDC42, TUBA1A, TUBA3C, SEPT2
<b>Organisation des Zytoskeletts</b>	TUBA1B, TUBA1C, TUBA4A, TUBB, TUBB3, TUBB4B	CDK1, CDC42, TUBA1A/TUBA3C*, SEPT2, SEPT10
<b>Andere</b>	RPS15A	PHGDH

die in shHTRA1 Zellen im Vergleich zur shLV Kontrolle weniger abundant waren<sup>9</sup>. Die Analyse ergab eine Übereinstimmung von 193 Proteinen aus dem PD mit HTRA1Δmac und 150 Proteinen aus dem PD mit HTRA1ΔPDZ. Diese Datensätze wiederum stimmten in 148 Proteinen überein. Folgendermaßen waren 148 Proteine PDZ unabhängige Interaktoren und 45 Proteine PDZ Liganden. Ein Vergleich mit der Liste der Zellzyklus-GOBP-terms zeigte, dass 12 der 148 PDZ unabhängigen Interaktoren (C9orf114, CDKN2A, ECT2, GADD45GIP1, HDAC3, MRPL41, NUP133, RBM14, RFC2, RFC3, RPS27/RPS27L und RRS1) und 3 der 45 PDZ Liganden (GOLGA2, KRT18 und P3H4) mit dem Zellzyklus assoziiert waren. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Interaktoren, die direkt mit dem HTRA1 Level korrelierten, keine Artefakte darstellten, sondern Proteine waren, die von HTRA1 aus regulatorischen Gründen vor einer Proteolyse geschützt wurden.

Die Ergebnisse der Proteom-Analyse von SW480 Zellen in Abhängigkeit des HTRA1 Levels und der Zellzyklusphase liefern Hinweise auf neue potentielle HTRA1 Substrate oder Interaktoren, sowie auf mögliche bisher unbekannte Funktionen von HTRA1 in Mikrotubuli-assoziierten Prozessen, der Regulation von Zellzykluskontrollpunkten und der Apoptose. Annexin A1 wurde als neues HTRA1 Substrat identifiziert.

### **3.6. Der Einfluss von HTRA1 auf den Tod von SW480 Zellen**

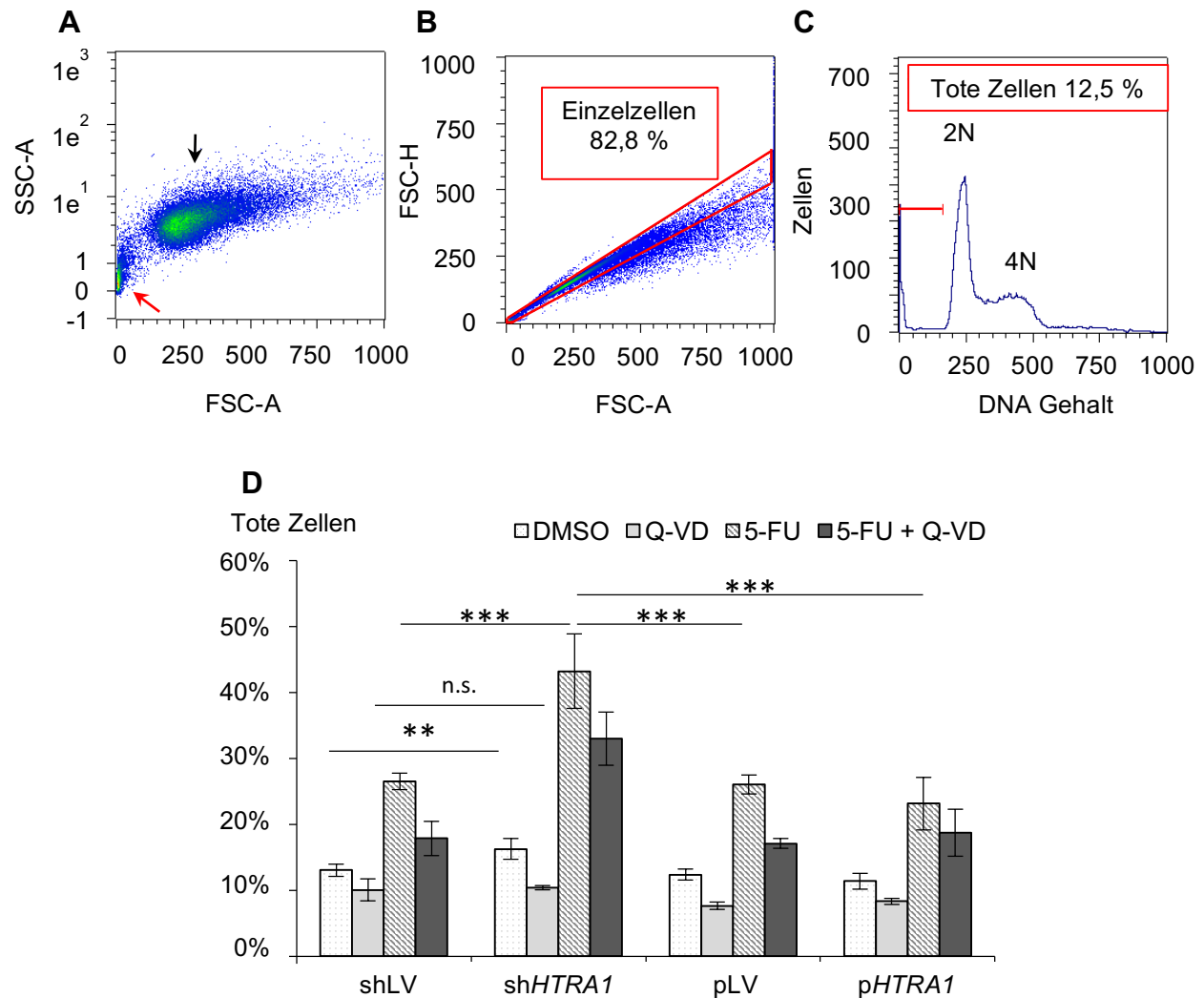
Die Ergebnisse der Proteom-Analyse deuten auf eine mögliche Rolle für HTRA1 in der Regulation von programmiertem Zelltod hin. Im Verlauf dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass *shHTRA1* Zellen schneller proliferieren und nach einer Synchronisation schneller den Zellzyklus durchlaufen (Abb. 3.3, Abb. 3.18). Außerdem wurde in vorherigen Arbeiten gezeigt, dass *shHTRA1* Zellen eine erhöhte Anzahl an Chromosomen und Zentrosomen besitzen (Schmidt *et al.*, 2016). Diese Beobachtungen weisen auf eine fehlende oder falsche Regulation von Zellzykluskontrollpunkten, sogenannten *Checkpoints*, hin. Eine mögliche Erklärung, warum ein *Knockout* von *Htra1* dennoch protektiv auf die Lebensspanne von Mäusen mit K-Ras(G12V) induzierten Darmpolypen wirkte ist, dass die Zellen der Polypen/Tumore ohne *Htra1* verstärkt apoptotisch waren. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden SW480 Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.3.7).

#### **3.6.1. Die Quantifizierung des Zelltodes in vier SW480 Zelllinien**

Um apoptotische Zellen in einer SW480 Zellpopulation zu quantifizieren, wurde das sogenannte „Nicoletti-Verfahren“ verwendet (Nicoletti *et al.*, 1991). Dabei werden die Zellkerne isoliert und die DNA mit dem DNA interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt (2.3.7). Durch eine PI Färbung kann der DNA Gehalt einer Zelle bestimmt werden (Abb. 3.33D). Lebende, euploide Zellen weisen nach einer Färbung mit PI ein typisches Histogramm mit einem 2N-Peak (G0/G1-Phase Zellen) und 4N-Peak (G2/M-Phase Zellen) auf. Replizierende Zellen (S-Phase) liegen vom DNA Gehalt zwischen 2N und 4N. Ein Kennzeichen von programmiertem Zelltod ist die Fragmentierung von DNA (Taylor *et al.*, 2008). Apoptotische Zellen zeigen daher einen zusätzlichen Peak nach PI Färbung, der im Histogramm links von dem 2N-Peak lokalisiert ist. Dieser wird im Folgenden als SubG1 bezeichnet. Da unter den hier verwendeten Bedingungen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass die SubG1-Population neben

apoptotischen auch nekrotische Zellen enthält, wird auf diese Population im Folgenden als „tote Zellen“ Bezug genommen. Neben einer Messung der basalen Level an toten Zellen, sollte außerdem die Induktion von Zelltod durch ein Zytostatikum analysiert werden. Hierzu wurde das DNA schädigende Agens 5-Fluorurazil (5-FU) verwendet, das bei der Behandlung von Patienten mit Kolonkarzinomen angewendet wird. Zur Etablierung der Bedingungen für eine effektive Induktion von Zelltod in SW480 Zellen, wurden sieben verschiedene Konzentrationen von 5-FU (50 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 25  $\mu$ M) und drei Behandlungszeiträume (24, 48, 72 h) getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei stellten sich eine Konzentration von 15  $\mu$ M und eine Behandlungsdauer von 72 h als optimale Bedingungen heraus, um einen möglichst großen Anteil toter Zellen zu erhalten. Im Anschluss an die Behandlung mit 5-FU oder DMSO wurden sowohl die Zellen als auch die Überstände geerntet, um keine abgerundeten Zellen zu verlieren. Dann wurden mittels Triton X-100 die Zellkerne isoliert und die DNA mit PI gefärbt (2.3.7).

Bei der Messung der Proben am MACSquant VYB Durchflusszytometer (Milenyi Biotec) zeigten sich die Zellkerne der SW480 Zellen als homogene Population (Abb. 3.33A). In einem ersten Schritt wurden Dubletten ausgeschlossen (Abb. 3.33B), um nur einzelne Zellkerne zu messen. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an toten Zellen bezogen auf alle Einzelzellen bestimmt (Abb. 3.33C). Die Quantifizierung toter Zellen in den Populationen aller SW480 Zelllinien ergab, dass sh*HTRA1* Zellen ohne Zugabe von 5-FU einen höheren Anteil an toten Zellen aufwiesen (16,3 %) als die shLV Kontrolle (13,1 %), die pLV Kontrolle (12,4 %) oder p*HTRA1* Zellen (11,4 %), welcher statistisch signifikant war (Ein-Weg-ANOVA,  $p\text{-value} < 0,001$ ) (Abb. 3.33D). Zwischen den anderen Zelllinien gab es keine signifikanten Unterschiede. Nach Behandlung der Zellen mit 15  $\mu$ M 5-FU für 72 h, war in allen Zelllinien eine signifikante Induktion von Zelltod verglichen mit den DMSO Kontrollen zu beobachten (zweiseitige t-Tests, sh*HTRA1*, shLV und pLV  $p\text{-value} < 0,0001$ ; p*HTRA1*  $p\text{-value} < 0,01$ ). Die Induktion war in sh*HTRA1* Zellen am stärksten und führte zu einem Anstieg toter Zellen auf 43,2 %. p*HTRA1* Zellen zeigten den geringsten Effekt (23,2 %) waren aber vergleichbar mit den shLV (26,5 %) und pLV (26,1 %) Kontrollzelllinien.



**Abb. 3.33 Quantifizierung toter SW480 Zellen nach Behandlung mit 5-FU und Q-VD**

**A)** Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse von SW480 Zellkernen (2.3.7) beispielhaft für DMSO behandelte shLV Zellen. In der Darstellung des *forward-scatter* (FSC) gegen den *sideward-scatter* (SSC) zeigten sich die SW480 Zellkerne als homogene Population (schwarzer Pfeil). Aufgetragen ist dabei die Fläche des gemessenen Signals (*area* = A). Die Kerne toter Zellen, apoptotische Körperchen und Zelltrümmer hatten eine kleinere Größe (roter Pfeil). **B)** Durch Auftragung der Fläche des gemessenen Signals (*area* = A) gegen die Höhe (*height* = H) im FSC wurden Dubletten aus der Messung ausgeschlossen. Nur einzelne Zellkerne (rote Markierung) wurden für die weitere Auswertung verwendet. **C)** Um den DNA Gehalt der Zellen zu bestimmen, wurde die DNA mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Gemessen wurde ein Histogramm mit einem Peak für Zellen mit einfachem (2N = G1) und doppeltem (4N = G2/M) DNA Gehalt. Tote Zellen mit fragmentierter DNA lagen vor dem G1-Peak (SubG1). Der prozentuale Anteil toter Zellen gemessen auf alle Einzelzellen wurde bestimmt. **D)** Durchflusszytometrische Analyse von SW480 Zellen nach Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD (10 µM), dem Zytostatikum 5-FU (15 µM) oder 5-FU und Q-VD für 72 h. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Zwischen den Zelllinien und Behandlungsarten bestanden signifikante Unterschiede. Durch Gabe von 5-FU wurde signifikant Zelltod induziert, durch Gabe von Q-VD signifikant reduziert (zweiseitige t-Tests, *p-value* < 0,05). shHTRA1 Zellen zeigten sowohl ohne als auch mit Behandlung mit 5-FU einen signifikant größeren Anteil toter Zellen als die anderen Zelllinien (Ein-Weg-ANOVA, *p-value* < 0,05 = \*; < 0,01 = \*\*; < 0,001 = \*\*\*). Dieser Unterschied wurde durch die Gabe von Q-VD in Abwesenheit von 5-FU aufgehoben, in Anwesenheit von 5-FU reduziert. n = 2 unabhängige Experimente, gemessen je in Duplikaten, mit Standardabweichung.

Caspasen sind die Schlüsselenzyme des programmierten Zelltodes (Talanian *et al.*, 1997, Taylor *et al.*, 2008, Julien und Wells 2017). Um festzustellen, ob es sich bei der beobachteten Form des Zelltodes um eine Caspase abhängige Form der Apoptose handelte, wurden die Zellen mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh Hydrat, kurz Q-VD, behandelt. Eine Behandlung der Zellen mit 10  $\mu$ M Q-VD für 72 h reduzierte die Fraktion toter Zellen im Vergleich zu den DMSO Kontrollen signifikant um ca. 3 – 6 % (zweiseitige t-Tests  $p\text{-value} < 0,05$ ). Die Menge an toten Zellen lag zwischen 7,3 % und 10,4 %. Die stärkste Reduktion war in shHTRA1 Zellen zu beobachten (-5,9 %). Die Menge an toten Zellen in shHTRA1 (10,4 %) war unter diesen Bedingungen vergleichbar mit der Menge toter Zellen in der shLV Kontrolle (10,1 %). Der zuvor beobachtete signifikante Unterschied zwischen diesen beiden Zelllinien schien also auf einem Caspase abhängigen Zelltod zu basieren. pHTRA1 (8,3 %) und pLV (7,7 %) Zellen zeigten einen etwas geringeren Anteil toter Zellen auch nach Behandlung mit Q-VD.

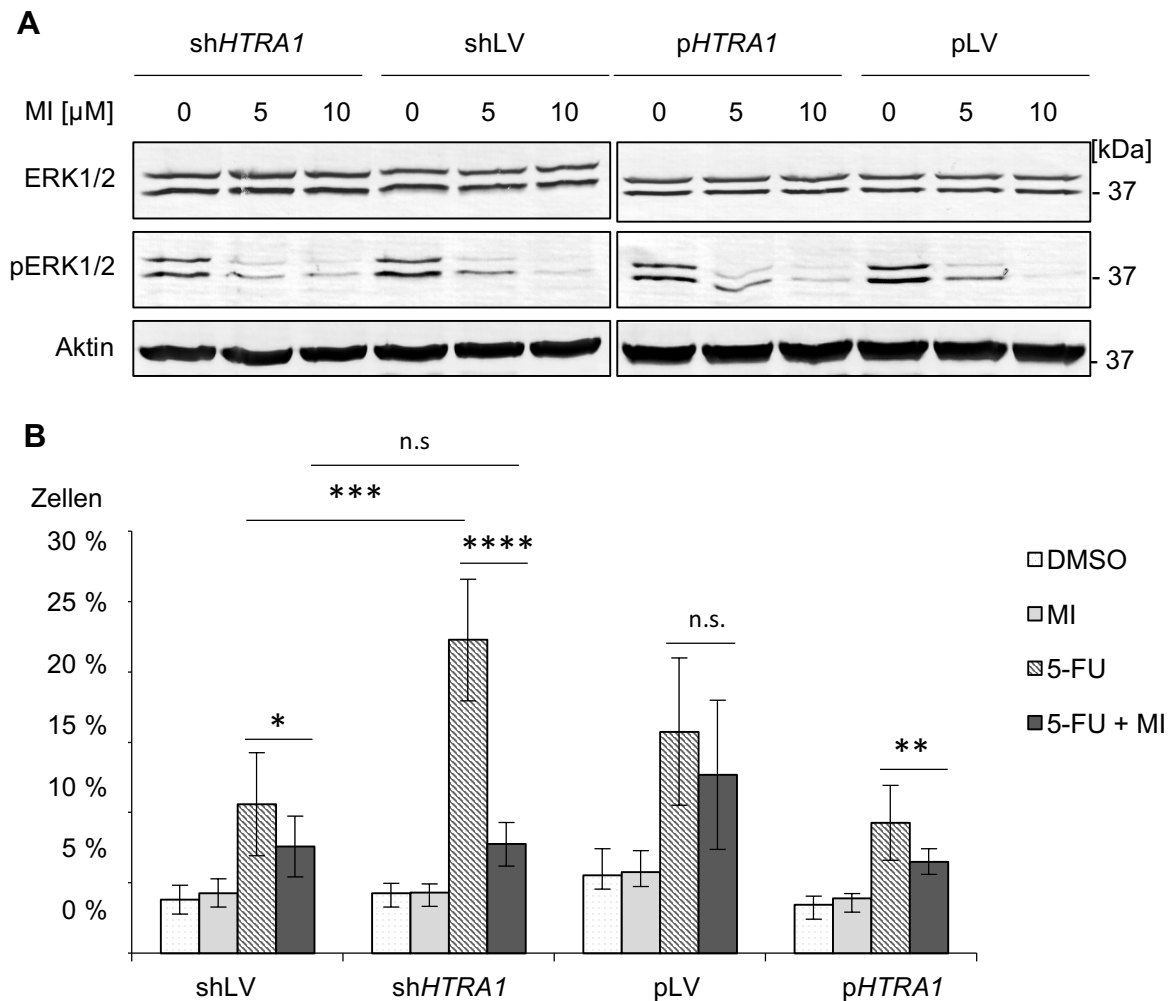
In einem weiteren Experiment wurden die Zellen für 72 h gleichzeitig mit 15  $\mu$ M 5-FU und 10  $\mu$ M Q-VD behandelt. In allen Zelllinien wurde durch die Gabe von 5-FU im Vergleich zu den DMSO Kontrollen erneut signifikant Zelltod induziert (zweiseitige t-Tests  $p\text{-value} < 0,05$ ). Jedoch lag der Anteil toter Zellen bei gleichzeitiger Gabe von Q-VD für alle Zelllinien außer pHTRA1 signifikant niedriger als bei alleiniger Gabe von 5-FU (zweiseitige t-Tests  $p\text{-value} < 0,05$ ). Dass Q-VD das Level toter Zellen in pHTRA1 nicht signifikant reduzierte, könnte daran liegen, dass diese Zellen von vornherein den geringsten Anteil toter Zellen aufwiesen. Der gemessene Anteil toter Zellen der vier Zelllinien war erneut vergleichbar für shLV (17,9 %), pLV (17,1 %) und pHTRA1 (18,7 %) Zellen. Ein signifikanter Unterschied zu diesen drei Zelllinien war wieder für die shHTRA1 Zellen zu beobachten (Ein-Weg-ANOVA,  $p\text{-value} < 0,001$ ), die einen deutlich höheren Anteil toter Zellen besaßen (33,0 %). Auch wenn dieser Unterschied durch die Gabe von Q-VD reduziert werden konnte, konnte der HTRA1 abhängige Effekt in der Induktion des Zelltodes nicht vollständig aufgehoben werden. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder wurde durch die 5-FU induzierte Schädigung der zellulären DNA ein großer Teil Caspase unabhängigen Zelltodes induziert oder die Zellen gingen bei längerer Behandlung mit 5-FU und Q-VD in eine Sekundärnekrose über (Silva 2010).



### 3.6.2. Der Einfluss des ERK-Signalweges auf den Tod von SW480 Zellen

Da der *Htra1* abhängige Effekt in den Maus-Experimenten nur in Gegenwart von mutiertem *K-ras* beobachtet werden konnte (3.1), sollte der Einfluss des ERK-Signalweges auf den Zelltod in SW480 Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen mit einem MEK-Inhibitor (MI) behandelt (Tab. 2.4). Eine Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion (2.4.8) von phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) zeigte eine fast vollständige Inhibition der Kinaseaktivität von MEK bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M MI (Abb. 3.34A).

Um den Anteil toter Zellen nach Behandlung mit dem MI zu quantifizieren, wurde erneut eine durchflusszytometrische Analyse von SW480 Zellen nach Isolation der Zellkerne und Färbung mit PI durchgeführt (3.6.1, 2.3.7). Die Ergebnisse zeigten, dass der MI alleine keine signifikanten Auswirkungen auf die Fraktion toter Zellen im Vergleich zu den DMSO Kontrollen hatte (zweiseitige t-Tests,  $p\text{-value} > 0,068$ ) (Abb. 3.34B). Die Behandlung der Zellen mit 5-FU führte nach 72 h auch in diesen Experimenten zu einer signifikanten Induktion des Zelltodes verglichen mit den DMSO Kontrollen (zweiseitige t-Tests,  $p\text{-value} < 0,0004$ ). Der Zelltod in sh*HTRA1* Zellen wurde erneut signifikant stärker induziert (22,3 %) als in den anderen Zelllinien (9,3 – 15,8 %) (Ein-Weg-ANOVA,  $p\text{-value} < 0,01$ ). In dieser Versuchsreihe wiesen die pLV Zellen (15,8 %) einen signifikant größeren Anteil toter Zellen mit und ohne Behandlung von 5-FU auf als die shLV (10,6 %) und p*HTRA1* (9,3 %) Zellen (Ein-Weg-ANOVA,  $p\text{-value} < 0,05$ ). Eine gleichzeitige Gabe von 5-FU und MI über 72 h führte in allen Zelllinien außer in pLV Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Induktion von Zelltod verglichen mit der Gabe von 5-FU alleine (zweiseitige t-Tests,  $p\text{-value} < 0,05$ ). Der signifikante Unterschied in der Anzahl toter Zellen zwischen sh*HTRA1* Zellen und den anderen Zelllinien wurde durch den MI vollständig aufgehoben (Ein-Weg-ANOVA,  $p\text{-value} > 0,0664$ ). Die experimentellen Daten zeigten zusammengefasst, dass der Verlust von *HTRA1* zu einer verstärkten Induktion von Zelltod nach DNA Schädigung durch 5-FU führte. Dieser Effekt wurde durch eine Inhibition des ERK-Signalweges aufgehoben und basierte zumindest teilweise auf einem Caspase abhängigen Zelltod.

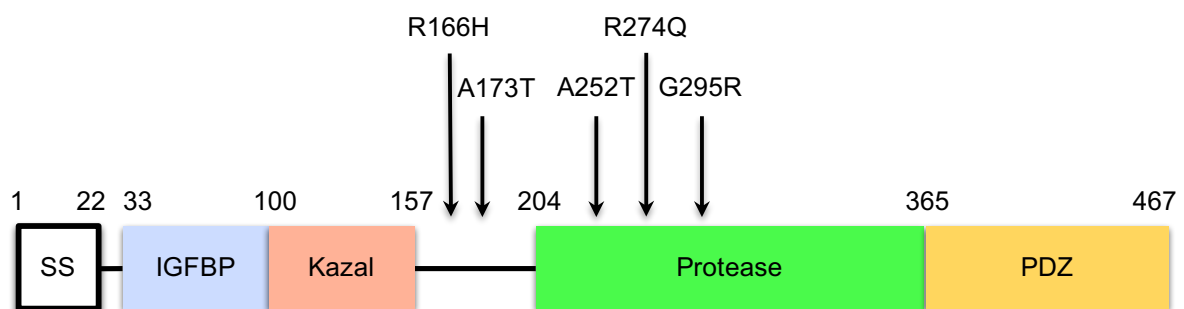


**Abb. 3.34 Quantifizierung toter SW480 Zellen nach Behandlung mit 5-FU und einem MEK Inhibitor**

**A)** Western Blot-Analyse mit anschließender Immundetektion von ERK1/2 und der phosphorylierten Form des Proteins (pERK1/2) aus SW480 Zelllysaten (2.3.5). Die Zellen wurden für 3 h mit 5 oder 10  $\mu$ M eines MEK-Inhibitors (MI) oder der entsprechenden Menge DMSO inkubiert. Aktin diente als Ladekontrolle. **B)** Durchflusszytometrische Analyse von SW480 Zellen nach Behandlung mit DMSO, einem MEK-Inhibitor (10  $\mu$ M), dem Zytostatikum 5-FU (15  $\mu$ M) oder 5-FU und MI für 72 h. Zwischen den Zelllinien und Behandlungsarten bestanden signifikante Unterschiede. Der MI alleine hatte keine signifikanten Auswirkungen (zweiseitige t-Tests,  $p$ -value > 0,068). Durch die Gabe von 5-FU wurde in allen Zellen signifikant Zelltod induziert (zweiseitige t-Tests,  $p$ -value < 0,0004). shHTRA1 Zellen zeigten nach Behandlung mit 5-FU erneut einen signifikant größeren Anteil toter Zellen als die anderen Zelllinien (Beispielhaft gezeigt für shLV, Ein-Weg-ANOVA,  $p$ -value < 0,001). Die Gleichzeitige Gabe von 5-FU und MI führte in allen Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion von Zelltod verglichen mit der Gabe von 5-FU alleine (zweiseitige t-Tests,  $p$ -value < 0,05 = \*; < 0,01 = \*\*; < 0,001 = \*\*\*; < 0,0001 = \*\*\*\*). Die signifikanten Unterschiede zwischen shHTRA1 und den anderen Zelllinien nach Gabe von 5-FU wurden durch die gleichzeitige Gabe des MI aufgehoben (Ein-Weg-ANOVA,  $p$ -value > 0,0664). n = 3 unabhängige Experimente, gemessen je in Triplikaten, mit Standardabweichung.

### 3.7. HTRA1 und CARASIL

Nachdem die Interaktion von HTRA1 mit dem ERK-Signalweg untersucht und mögliche Funktionen von HTRA1 in Zellzyklus und Apoptose beschrieben wurden, sollte das Augenmerk dieser Arbeit zusätzlich auf die einzige bekannte monogenetische Erkrankung des humanen *HTRA1* Gens – CARASIL – gelegt werden (1.4.2). CARASIL wird durch Mutationen verursacht, die zum Funktionsverlust von HTRA1 führen. Ursprünglich beschriebene Mutationen im *HTRA1* Gen wie beispielsweise A252T oder V297M führen zu einer Reduktion der proteolytischen Aktivität (Hara *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurden weitere klinisch relevante Mutationen beschrieben, deren Effekt auf das HTRA1 Protein bisher nicht charakterisiert ist (Menezes Cordeiro *et al.*, 2015). Hier sollte deshalb die Aktivität vier solcher Mutationen (R166H, A173T, R274Q und G295R) näher untersucht werden. Die Lage der untersuchten Mutationen in der Proteinsequenz von HTRA1 zeigte, dass die Mutationen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Proteasedomäne liegen (Abb. 3.35). Bekannte Mutationen wie A252T liegen ebenfalls innerhalb der Proteasedomäne. Um einen Anhaltspunkt dafür zu erhalten, wie die Mutationen das HTRA1 Protein beeinflussen, wurde die räumliche Lage der Mutationen innerhalb des HTRA1 Trimers in einer Computer-basierten Strukturanalyse überprüft.<sup>11</sup> (Abb. 3.36)

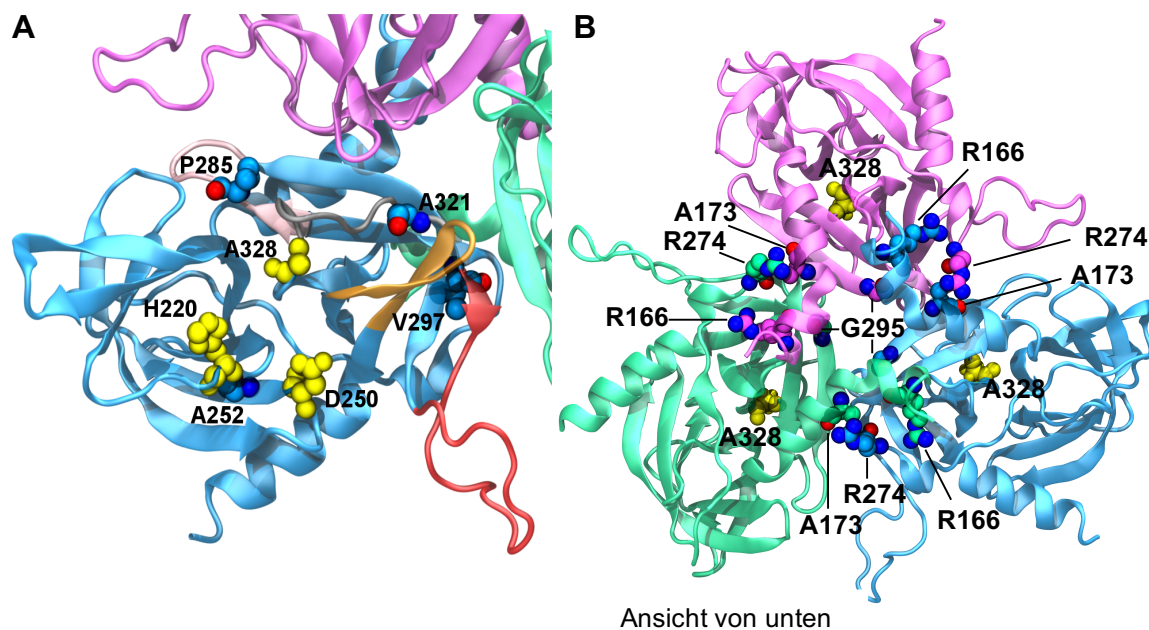


**Abb. 3.35 Lokalisation CARASIL relevanter Mutationen im HTRA1 Protein**

Schematisch dargestellt ist die Lage der untersuchten Mutationen aus CARASIL (Pfeile) innerhalb des HTRA1 Proteins. Die entsprechenden Nummern der Aminosäuren sind angegeben. Drei der fünf untersuchten Mutationen liegen innerhalb der Proteasedomäne. Für eine ausführliche Beschreibung der Domänenstruktur von HTRA1 siehe 1.3 bzw. Abb. 1.1.

<sup>11</sup> Die Computer-basierte Strukturanalyse der HTRA1 Mutanten wurde von Dr. Kenny Bravo Rodriguez (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland) durchgeführt.

(Truebestein *et al.*, 2011, Eigenbrot *et al.*, 2012). Laut dieser Analyse sind die Aminosäuren A252 und V297 gemeinsam mit den Aminosäuren P285 und A321 vermutlich an der korrekten Faltung des aktiven Zentrums beteiligt (Abb. 3.37A). Die Aminosäuren R166, A173, R274 und G295 hingegen liegen im Trimer-*Interface* von HTRA1 (Abb. 3.37B). Es ist deshalb naheliegend, dass eine Mutation dieser Aminosäuren den oligomeren Zustand von HTRA1 beeinflusst. Neben der Aktivität sollte deshalb auch der Oligomerisierungszustand der vier HTRA1 Mutanten analysiert werden. Zum Vergleich wurde die Mutante HTRA1(A252T) aus dem aktiven Zentrum ebenfalls analysiert. Um den Effekt der fünf Mutationen auf das HTRA1 Protein biochemisch zu charakterisieren, wurden die Proteine aus dem Zellkulturüberstand stabil transfizierter HEK293T Zellen mittels Affinitätschromatographie (His<sub>6</sub>-Tag) gereinigt<sup>12</sup>. Hierfür wurde stets die ungekürzte Form des Proteins verwendet (51 kDa).



**Abb. 3.36 Lage CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten im HTRA1 Trimer**

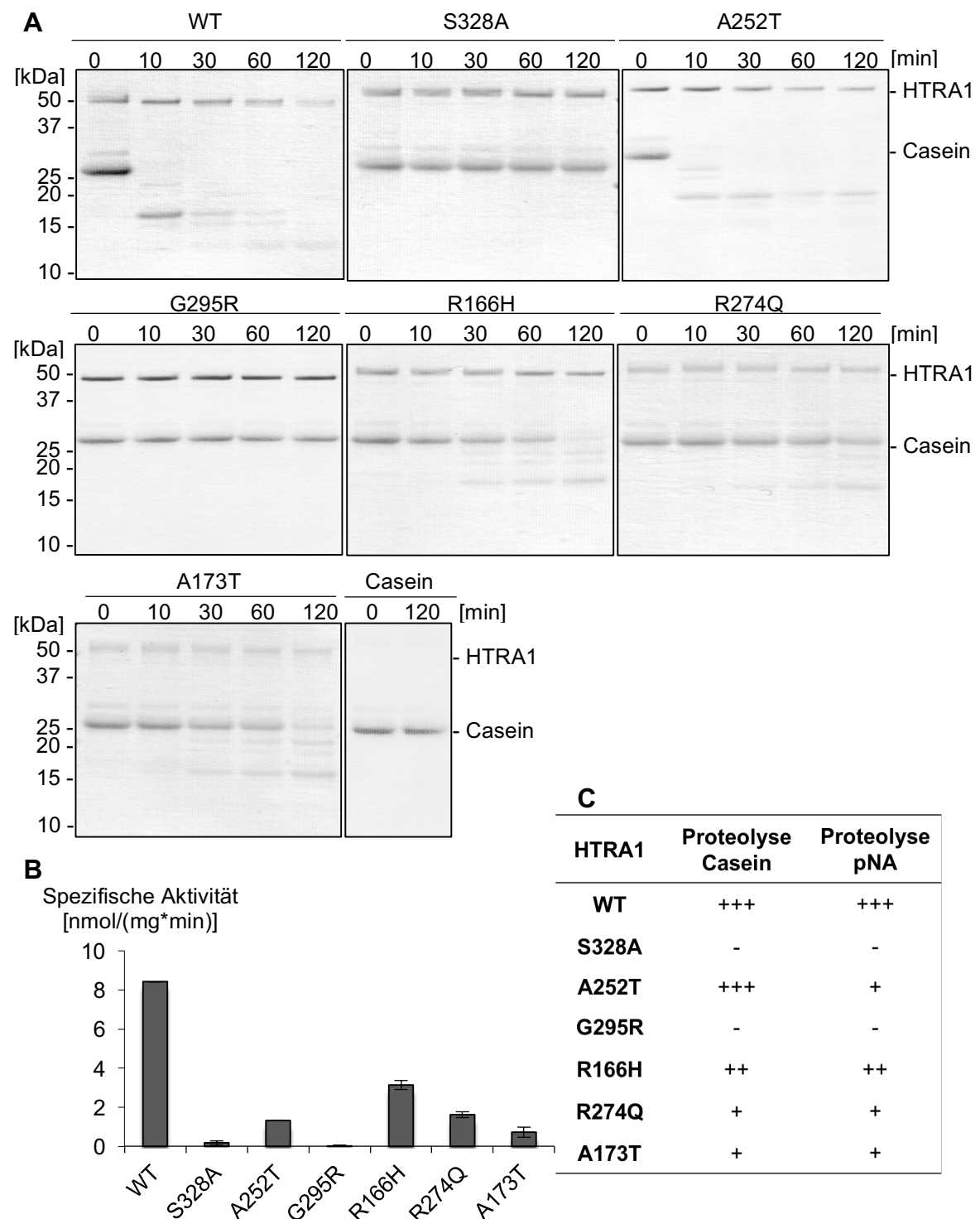
Gezeigt sind die Ergebnisse einer Computer-basierten Strukturanalyse von Dr. Kenny Bravo Rodriguez (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland) des HTRA1 Trimers (Truebestein *et al.*, 2011, Eigenbrot *et al.*, 2012). Die einzelnen Monomere sind der Übersicht halber in unterschiedlichen Farben dargestellt (blau, grün, magenta). **A)** Darstellung des aktiven Zentrums eines HTRA1 Monomers (blau) aus dem aktiven HTRA1 Trimer. Die katalytische Triade (A328, H220 und D250) ist in gelb, die Loops L1, L2, L3 und LD sind in grau, braun, rot und rosa dargestellt. Die Aminosäuren A252, P285, V297 und A321 liegen innerhalb des aktiven Zentrums. **B)** Dargestellt ist die Lage der Aminosäuren R166, A173, R274, und G295 innerhalb des HTRA1 Trimers (Kugel-Darstellung). Die Aminosäure A328 (gelb) markiert die Lage des aktiven Zentrums.

<sup>12</sup> Die gereinigten Proteine wurden von Dr. Nathalie Beaufort (Institute for Stroke and Dementia Research, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt

### 3.7.1. Die proteolytische Aktivität CARASIL-relevanter HTRA1 Mutanten

Für eine Charakterisierung der proteolytischen Aktivität wurden die beschriebenen HTRA1 Mutanten in zwei verschiedenen Enzym-Assays getestet. Zunächst wurde die Proteolyse von  $\beta$ -Casein analysiert (2.4.11). Die Proteasen wurden dafür über 120 min bei 37 °C mit  $\beta$ -Casein inkubiert. Protease und Substrat wurden im Verhältnis 1:10 (1  $\mu$ M:10  $\mu$ M) eingesetzt. Nach 0, 10, 30, 60 und 120 min wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.4.5). Die resultierenden SDS-Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt (Abb. 3.37A) (2.4.6). Als Kontrolle wurde die Proteolyse ebenfalls mit nicht mutiertem HTRA1(WT) und inaktivem HTRA1(S328A) durchgeführt.  $\beta$ -Casein alleine war unter den beschriebenen Bedingungen über 120 min stabil. Bei Inkubation mit HTRA1(WT) und HTRA1(A252T) war ein vollständiger Abbau von  $\beta$ -Casein bereits nach 10 min zu beobachten. Dabei entstanden mehrere Banden kleinerer Größe, die vermutlich den Abbauprodukten von  $\beta$ -Casein entsprachen. Alle anderen Mutanten zeigten eine reduzierte proteolytische Aktivität. Für HTRA1(R166H) war nach 120 min ein deutlicher Abbau von  $\beta$ -Casein zu erkennen. Erste Abbauprodukte waren bereits nach 30 min detektierbar. HTRA1(A173T) und (R274Q) zeigten nach 120 min hingegen nur einen leichten Abbau von  $\beta$ -Casein. Für HTRA1(S328A) und HTRA1(G295R) war unter diesen Bedingungen über 120 min keine proteolytische Aktivität detektierbar.

Um die proteolytische Aktivität von HTRA1 in einem besser quantifizierbaren Assay zu untersuchen, wurden die Mutanten in einem pNA-Assay getestet (2.4.12). Dazu wurden die Proteasen mit einem pNA-Substrat inkubiert (VFNTLPMMGKASPV-pNA) (Tab. 2.13). Bei pNA-Substraten handelt es sich um Peptide, die C-terminal an eine para-Nitroanilin-Gruppe (pNA) gekoppelt sind. Bei Abspaltung der pNA-Gruppe kann spektrophotometrisch eine Erhöhung der Absorption bei 405 nm gemessen werden. Protease und Substrat wurden im Verhältnis 1:500 (1  $\mu$ M:500  $\mu$ M) eingesetzt. Die Proteolyse erfolgte bei 37 °C. Die Absorption wurde über 120 min jede Minute gemessen. Anschließend wurde die spezifische Aktivität der Proteasen berechnet (2.4.12). Für HTRA1(WT) wurde eine spezifische Aktivität von 8,4 nmol/(mg\*min) gemessen. Diese lag in einem Bereich, der bereits in früheren Experimenten für HTRA1(WT) bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu zeigten alle Mutanten eine stark verringerte spezifische Aktivität (Abb. 3.37B). HTRA1(R166H) zeigte die höchste spezifische Aktivität von 3,1 nmol/(mg\*min). Darauf folgten

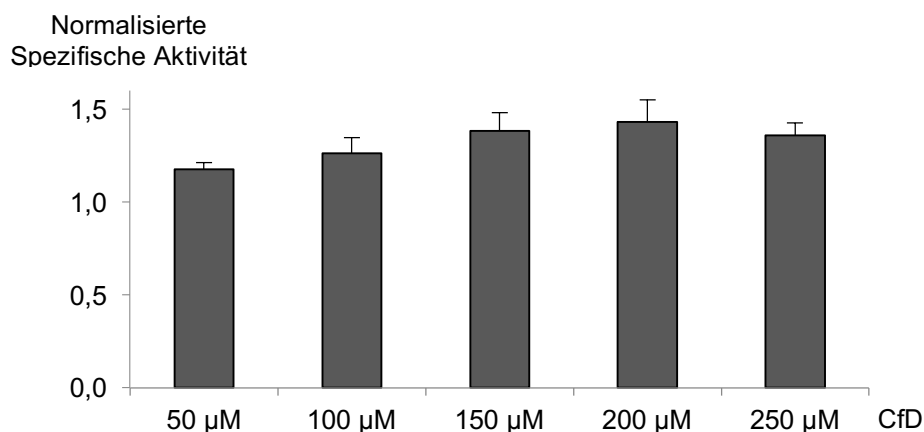


**Abb. 3.37 Proteolytische Aktivität CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten**

**A)** Proteolyse von  $\beta$ -Casein (10  $\mu$ M) durch verschiedene HTRA1 Varianten (1  $\mu$ M) (2.4.11). Nicht mutiertes HTRA1 (WT) und inaktives HTRA1 (S328A) dienten als Kontrollen. Proben wurden nach 0, 10, 30, 60 und 120 min entnommen und mittels SDS-PAGE (2.4.5) mit anschließender Coomassie-Färbung (2.4.6) analysiert.  $n = 2$  unabhängige Experimente. **B)** Die spezifische Aktivität der HTRA1 Mutanten wurde durch die Proteolyse eines pNA-Substrates bestimmt (2.4.12). Die Absorption bei 405 nm wurde über 120 min jede Minute an einem Spektrophotometer gemessen.  $n = 2$  unabhängige Experimente, je in Duplikaten. **C)** Zusammenfassung der Ergebnisse aus **(A)** und **(B)**.

HTRA1(R274Q) mit 1,6 nmol/(mg\*min), HTRA1(A252T) mit 1,3 nmol/(mg\*min) und HTRA1(A173T) mit 0,7 nmol/(mg\*min). HTRA1(S328A) und HTRA1(G295R) wiesen auch in dieser Analyse keine Aktivität auf (0,2 und 0 nmol/(mg\*min)).

Die durchgeführten Enzym-Assays zeigten, dass alle analysierten Mutanten im Vergleich zum HTRA1(WT) eine verringerte proteolytische Aktivität aufwiesen (Abb. 3.37C). HTRA1(A252T) zeigte bei der Proteolyse von  $\beta$ -Casein eine ähnliche Aktivität zum HTRA1(WT), im pNA-Assay jedoch eine ca. 6,5-fach verringerte spezifische Aktivität. Dies lag vermutlich an den unterschiedlichen Affinitäten für die verwendeten Substrate. Während  $\beta$ -Casein ein vollständiges aber unstrukturiertes Protein ist, handelt es sich bei dem pNA-Substrat um ein kurzes Peptid. Die vier weiteren Mutanten verhielten sich anders. Sie zeigten in beiden Enzym-Assays ein vergleichbares Verhalten. Von den vier Mutanten zeigte HTRA1(R166H) die höchste Aktivität (2,7-fach verringert). Die Aktivität von HTRA1(R274Q) und HTRA1(A173T) war noch geringer (5,3- und 12-fach verringert), während HTRA1(G295R) keine proteolytische Aktivität zeigte. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass auch Mutationen außerhalb des aktiven Zentrums von HTRA1 einen negativen Einfluss auf die proteolytische Aktivität von HTRA1 haben können.



**Abb. 3.38 Proteolytische Aktivität von HTRA1(R166H) in Anwesenheit des CfD-Peptides**

Die spezifische Aktivität der HTRA1 Mutante R166H wurde durch die Proteolyse eines pNA-Substrates bestimmt (2.4.12). Vor Zugabe des Substrates wurde HTRA1(R166H) gemeinsam mit verschiedenen Konzentrationen des CfD-Peptids für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde nach Zugabe des Substrates bei 405 nm über 120 min jede Minute an einem Spektrophotometer gemessen. Die berechnete spezifische Aktivität wurde auf die Kontrolle ohne Zugabe des Peptides normalisiert. n = 2 unabhängige Experimente, je in Duplikaten.

Anschließend wurde die Mutante R166H beispielhaft mit verschiedenen Konzentrationen eines Peptides inkubiert, das dem C-Terminus des humanen Komplementfaktor D (CfD) entspricht (SYAAWIDSVLA). Vor Zugabe des pNA-Substrates wurde HTRA1(R166H) für 5 min mit fünf verschiedenen Konzentrationen dieses Peptids bei 37 °C inkubiert. Die Messung der spezifischen Aktivität erfolgte erneut über 120 min und wurde auf die Kontrolle ohne Zugabe des Peptides normalisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktivität der Mutante um maximal 43 % gesteigert werden konnte. Diese maximale Aktivierung war bei Konzentration von 200 µM Peptid erreicht. Größere Mengen des Peptides führten zu keiner weiteren Aktivierung, was für eine spezifische Bindung des Peptides an HTRA1 spricht. Die minimale Aktivierung bei einer Konzentration von 50 µM betrug 18 %.

### 3.7.2. Der oligomere Zustand CARASIL-relevanter HTRA1 Mutanten

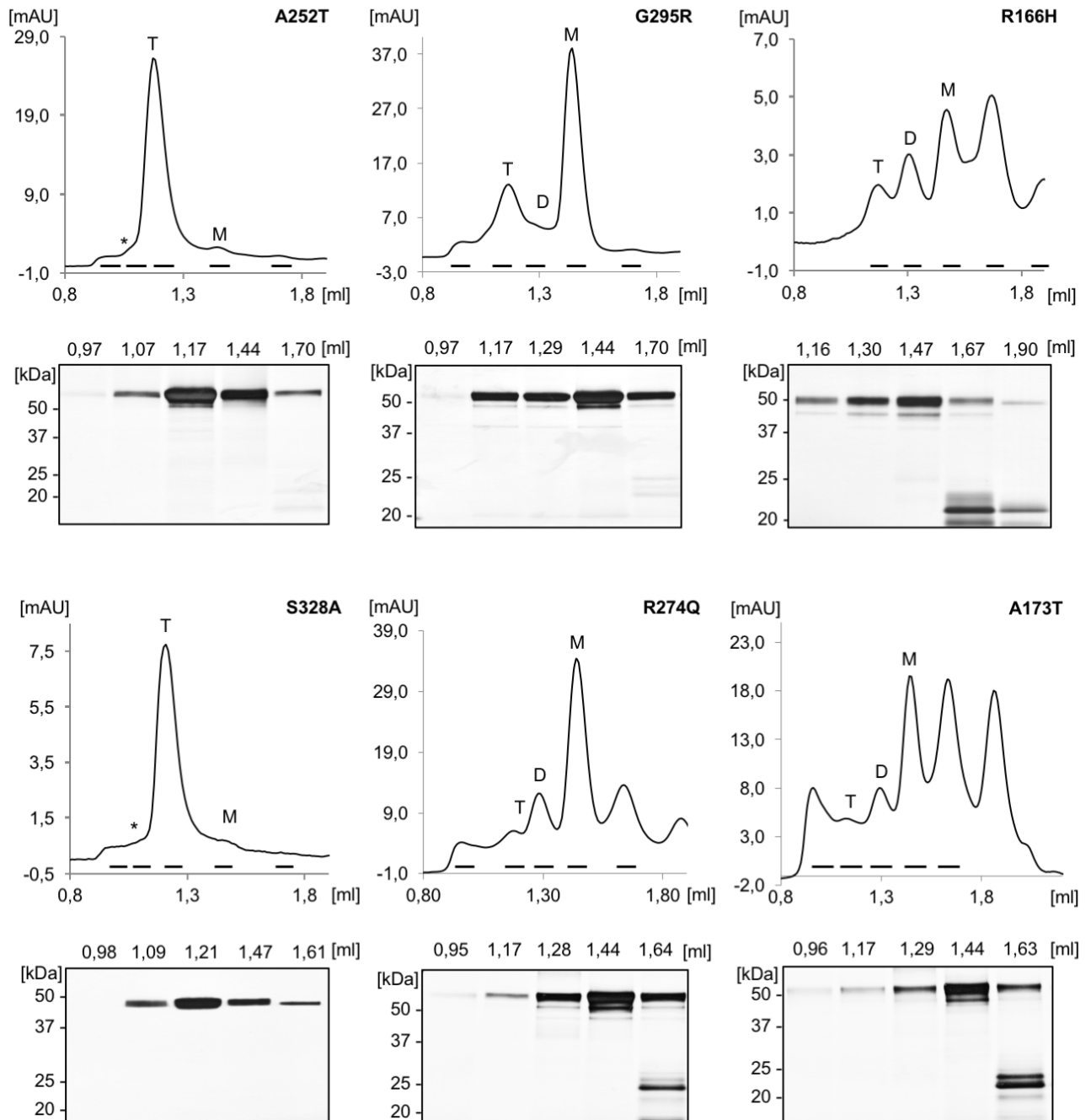
Die strukturelle Analyse der Aminosäuren R166, A173, R274 und G295 ergab, dass diese Aminosäuren im *Interface* zwischen den einzelnen Monomeren des HTRA1 Trimers lokalisiert waren<sup>13</sup> (Abb. 3.36). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ein Verlust der trimeren Struktur von HTRA1 zu der beschriebenen reduzierten proteolytischen Aktivität führen könnte. Der oligomere Zustand der HTRA1 Mutanten wurde in analytischer SEC und *Crosslink*-Experimenten untersucht.

Die inaktive HTRA1(S328A) Mutante unterscheidet sich in ihrem oligomeren Zustand nicht von HTRA1(WT) (Daten nicht gezeigt), unterliegt aber im Gegensatz zu HTRA1(WT) keiner Autoproteolyse und wurde deshalb als Kontrolle gewählt. Für die analytische SEC (2.4.13) wurden die Proteine mit einer Konzentration von 100 µM auf die Chromatographiesäule (Superdex 200 3.2/300) geladen (Abb. 3.39). Fraktionen der gemessenen Peaks wurden anschließend mittels SDS-PAGE (2.4.5) aufgetrennt und durch eine Silberfärbung (2.4.7) visualisiert (Abb. 3.39). Eine Kalibrierung der verwendeten Chromatographiesäule mit einem Proteinstandard (Tab. 2.14) ließ eine Berechnung der ungefähren Größen der eluierten Proteine zu. HTRA1(S328A) zeigte einen großen Peak mit einem Elutionsvolumen bei 1,17 ml (295 kDa), der dem HTRA1

---

<sup>13</sup> Die Computer-basierte Strukturanalyse der HTRA1 Mutanten wurde von Dr. Kenny Bravo Rodriguez (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland) durchgeführt.





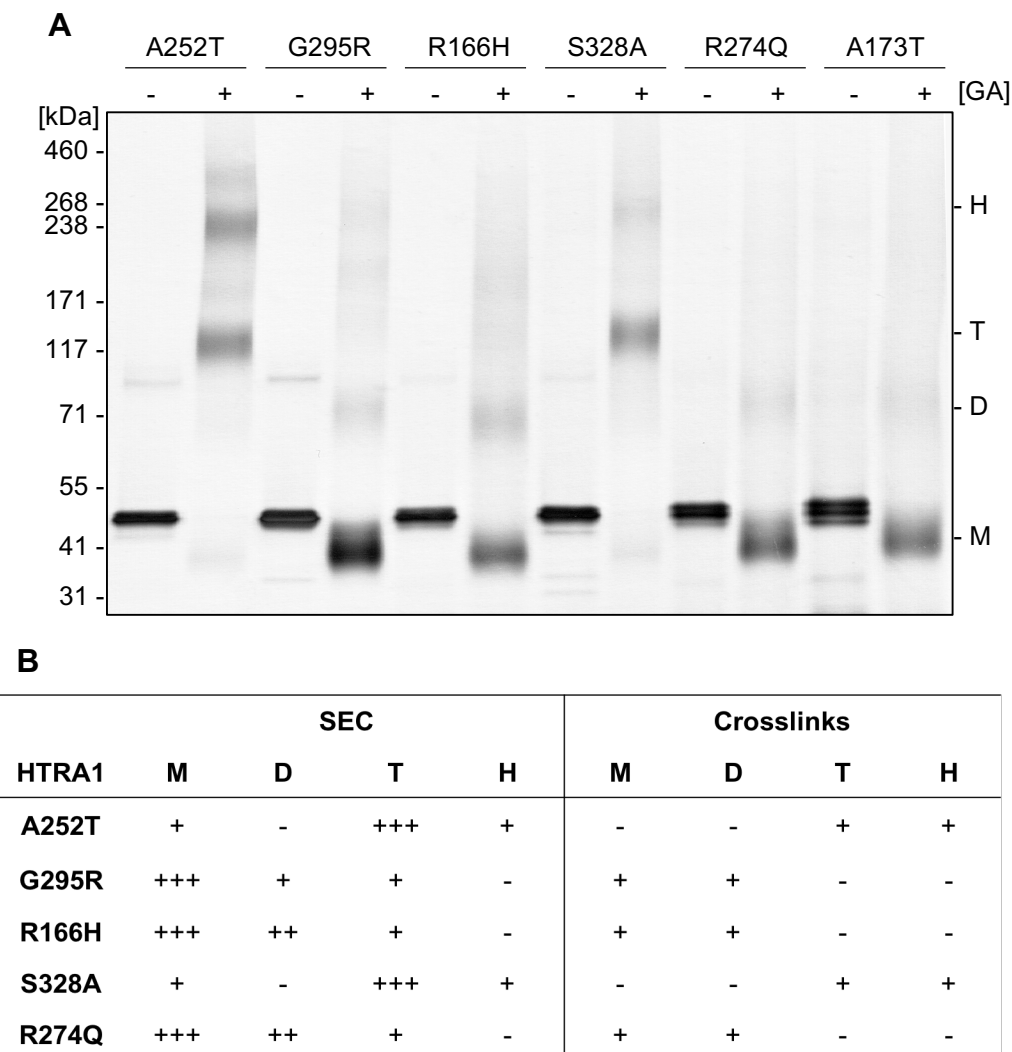
**Abb. 3.39 Oligomerisierungszustand CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten in der analytischen SEC**

Gezeigt sind die Ergebnisse der Analyse von sechs HTRA1 Varianten mittels SEC (2.4.13) und anschließender Detektion mittels SDS-PAGE (2.4.5) und Silberfärbung (2.4.7). Die Peaks bei den Elutionsvolumina von ca. 1,17 und 1,44 ml entsprachen dem HTRA1 Trimer (T) und Monomer (M). Zusätzlich wurde bei einigen Messungen ein Peak bei ca. 1,64 ml detektiert, der dem HTRA1 Dimer (D) entsprach. Ein Peak bei ca. 1,07 ml entsprach vermutlich höheren HTRA1 Oligomeren (\*). Die Fraktionen, an denen Proben entnommen wurden, sind in den Chromatogrammen markiert. n = mindestens 2 unabhängige Experimente.

Trimer entsprach und einen kleinen Peak bei 1,44 ml (80 kDa), der das HTRA1 Monomer enthielt. Die hier berechneten Größen für Monomer und Trimer wichen stark von den theoretischen Größen (51 und 153 kDa) ab. Das folgende *Crosslink*-Experiment (s.u.) bestätigt jedoch die hier gemessenen Verhältnisse von Monomer zu Trimer für die einzelnen Mutanten. Dies könnte zum einen an technischen Problemen mit der verwendeten Chromatographiesäule liegen. Jedoch war mit derselben Säule in anderen analytischen Größenausschlusschromatographien eine recht präzise Berechnung der molekularen Massen möglich, wenn rekombinantes HTRA1 $\Delta$ mac gereinigt aus *E. coli* verwendet wurde (3.3.2). Deshalb ist wahrscheinlicher, dass posttranslationale Modifikationen die molare Masse und das Auftrennungsverhalten von HTRA1 verändern. Darüber hinaus enthalten die IGFBP- und Kazal-ähnliche Domäne von HTRA1 insgesamt 16 Cystein-Reste, die Disulfidbrücken ausbilden und so die biochemischen Eigenschaften des Proteins beeinflussen (Zumbrunn und Trueb 1996).

Neben den Peaks bei 1,17 und 1,44 ml wurden weitere Peaks bei 0,97 ml, was dem Ausschlussvolumen der Säule entsprach und 1,07 ml detektiert (773 und 477 kDa). Der Peak bei Größe des Ausschlussvolumens der Säule beinhaltete vermutlich Aggregate. In der Analyse der Proben mittels SDS-PAGE war hier kaum HTRA1 detektierbar. Proteine, die bei 1,07 ml eluierten, könnten einem höheren Oligomer von HTRA1 entsprechen. Kleinere Peaks zwischen 1,6 und 1,9 ml (37 – 9 kDa) enthielten vermutlich Abbauprodukte von HTRA1. Genau wie HTRA1(S328A) zeigte HTRA1(A252T) hauptsächlich das HTRA1 Trimer. Die vier anderen Mutanten eluierten hauptsächlich als Monomer. Sie zeigten kleine oder gar keine Trimer- oder Dimer-Peaks (1,28 ml, 174 kDa). Interessanterweise zeigten die Mutanten mit der geringsten proteolytischen Aktivität (HTRA1(A173T) und (G295R)) auch die größte Menge an monomerem HTRA1. Umgekehrt zeigte die aktivste der vier Mutanten HTRA1(R166H) den größten Anteil an trimerem HTRA1. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante HTRA1(A252T) keine Veränderung des oligomeren Zustandes.

Um die oligomeren Zustände der HTRA1 Mutanten mit einer weiteren Methode zu untersuchen, wurden die Proteine in einem *Crosslink*-Experiment (2.4.14) charakterisiert. Um die HTRA1 Oligomere zu *crosslinken*, wurden die Proteine bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch



**Abb. 3.40 Oligomerisierungszustand CARASIL relevanter HTRA1 Mutanten in der Crosslink-Analyse**

**A)** Ergebnisse der Crosslink-Analyse. 0,5 µM HTRA1 wurde für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd (GA) wurden nach 0 (-) und 2 min (+) Proben entnommen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe einer Stopplösung (1:10) beendet. Die Proben wurden für 10 min bei 40°C in SDS-Probenpuffer ohne DTT inkubiert und im Anschluss mittels SDS-PAGE aufgetrennt (NuPAGE Novex Midi Gel, Invitrogen). Die Proteine wurden durch eine Silberfärbung visualisiert (2.4.7). **B)** Zusammenfassung der Detektion oligomerer Zustände in SEC (Abb. 3.39) und Crosslink-Analyse (**A**). M = Monomer, D = Dimer, T = Trimer, H = Hexamer

Zugabe von 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd für 2 min *gecrosslinkt*. Nach Beenden der Reaktion wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (2.4.5) elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung (2.4.7) visualisiert (Abb. 3.40). Die Crosslink-Analyse (Abb. 3.40A) zeigte vergleichbare Ergebnisse zur analytischen SEC (Abb. 3.39). Für HTRA1(S328A) und HTRA1(A252T) war nach Inkubation mit Glutaraldehyd für 2 min eine deutliche Verschiebung der Bande zur Größe des HTRA1 Trimers (153 kDa) detektierbar. Beide Proteine zeigten nur sehr schwache Banden bei Größe des

---

Monomers (51 kDa). Darüber hinaus war für beide Proteine eine größere Bande zu beobachten, die dem HTRA1 Hexamer entsprach. Diese war für HTRA1(A252T) deutlicher sichtbar. HTRA1(A252T) wies außerdem eine noch größere oligomere Struktur auf, die von der Größe am ehesten einem Nonamer gleichkam. Die vier anderen Mutanten zeigten nach Inkubation mit Glutaraldehyd deutliche Banden auf Höhe des HTRA1 Monomers und nur eine schwache Verschiebung der Bande zur Größe eines HTRA1 Dimers. Für keine der Mutanten konnte eine Bande auf Trimer- oder Hexamer-Größe detektiert werden.

Die Ergebnisse aus analytischer SEC und Crosslink-Analyse sind in Abb. 3.40B zusammengefasst. Sie lassen darauf schließen, dass die verringerte proteolytische Aktivität der HTRA1 Mutanten, die im Trimer-*Interface* lokalisiert sind (R166H, A173T, R274Q, G295R), durch einen Verlust der trimeren Struktur von HTRA1 verursacht wird. Im Gegensatz dazu verursacht die Mutation A252T einen Verlust der proteolytischen Aktivität vermutlich über eine Fehlfaltung des aktiven Zentrums. Der oligomere Zustand von HTRA1 war für diese Mutante wie erwartet unverändert.

## 4. Diskussion

Der humanen Serinprotease HTRA1 werden eine Vielzahl von Funktionen innerhalb und außerhalb der Zelle zugesprochen. Durch die extrazelluläre Proteolyse der ECM, von A $\beta$  und TGF- $\beta$ , sowie die intrazelluläre Proteolyse von Tubulin, TSC2, Tau und XIAP steht HTRA1 mit Osteoarthritis, Morbus Alzheimer, der altersbedingten Makuladegeneration, CARASIL und diversen Tumorerkrankungen in Verbindung (1.4). Die Implikation von HTRA1 in so verschiedenartige Pathologien deutet auf eine wichtige Funktion der Protease in regulatorischen Prozessen der Zelle hin. HTRA1 stellt für die meisten dieser Erkrankungen ein interessantes therapeutisches Ziel dar. Eine genauere Analyse der biochemischen und zellulären Funktionen von HTRA1 sind deshalb wichtig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Implikation von HTRA1 in Tumorerkrankungen und CARASIL gelegt.

### 4.1. Die Interaktion von HTRA1 und dem ERK-Signalweg

In einem *in vivo* Experiment wurde vor Beginn dieser Arbeit der Einfluss von *Htra1* in der Entstehung von Kolonkarzinomen in verschiedenen aggressiven Tumor-Mausmodellen untersucht (Davies *et al.*, 2014)<sup>14</sup>. Ein *Knockout* von *Htra1* verlängerte in zwei von vier Tumor-Mausmodellen das Überleben der Mäuse signifikant und zeigte somit einen protektiven Effekt (Abb. 3.1). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der beschriebenen tumorsuppressiven Funktion von HTRA1 (Baldi *et al.*, 2002, Chien *et al.*, 2004). Da die Mutation von *K-ras* für den *Htra1* abhängigen Effekt entscheidend war (3.1) und B-RAF und C-RAF in einem Peptidscreen als potentielle HTRA1 Liganden identifiziert wurden (Boisguerin *et al.*, 2004, Boisguerin *et al.*, 2007)<sup>15</sup>, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine mögliche Interaktion von HTRA1 mit den Proteinen des ERK-Signalweges analysiert werden. Die verwendeten SW480 Zelllinien wiesen bei verminderter *HTRA1* Expression eine erhöhte Anzahl von Chromosomen und Zentrosomen auf (Schmidt *et al.*, 2016) und zeigten eine erhöhte Proliferation sowie Zellzyklusprogression (Abb. 3.3, Abb. 3.18). Diese Beobachtungen sprechen für eine regulatorische Funktion von HTRA1 innerhalb des Zellzyklus.

---

<sup>14</sup> Das *in vivo* Experiment wurde von Kirsty Greenow, Alan R. Clarke und Kollegen (Cardiff University, Cardiff, UK) durchgeführt

<sup>15</sup> Der Peptidscreen wurde von Prisca Boisguerin und Rudolf Volkmer (Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

#### 4.1.1. HTRA1 interagiert mit C-RAF

In IPs und PD Experimenten mit SW480 Zelllysaten konnte eine PDZ abhängige Interaktion von HTRA1 mit C-RAF nachgewiesen werden (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Diese Ergebnisse wurden auch durch PD-Experimente aus HeLa Zelllysaten bestätigt (persönliche Kommunikation Katharina Severin) (3.5.6). Eine Kollokalisierung beider Proteine in humanen SW480 Zellen scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit möglich, konnte jedoch aus technischen Gründen nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.9 – Abb. 3.14). Mittels analytischer SEC konnte *in vitro* die Bildung eines Komplexes aus rekombinantem HTRA1 $\Delta$ mac(SA) und der RBD von C-RAF nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Da eine Reinigung von C-RAF aus *E. coli* nicht möglich war, wurde die gereinigte RBD verwendet, die essentiell für die Interaktion von RAS und RAF und somit für die RAF Aktivierung ist (Marais *et al.*, 1995).

**Tab. 4.1 Mögliche Stöchiometrien eines HTRA1 $\Delta$ mac-RBD-Komplexes**

Dargestellt sind Berechnungen der theoretischen Größen eines Komplexes aus HTRA1 $\Delta$ mac(SA) und der RBD von C-RAF. Das HTRA1 $\Delta$ mac Trimer hat eine theoretische molekulare Masse von 111 kDa. In der analytischen SEC eluierte das Trimer bei einer berechneten molekularen Masse von 136,6 kDa. Die RBD eluierte bei einer berechneten molekularen Masse von 9,7 kDa, während die theoretische Masse 9,6 kDa entsprach. Nach Bildung des Komplexes eluierten beide Proteine gemeinsam bei einer berechneten molekularen Masse von 150,3 kDa und 281,1 kDa. Mögliche Stöchiometrien des Komplexes wurden sowohl mit den berechneten Massen aus den Einzelanalysen beider Proteine als auch mit den theoretischen molekularen Massen kalkuliert.

Stöchiometrie des Komplexes [HTRA1 $\Delta$ mac : RBD]	Kalkulation der molekularen Masse laut SEC Einzelanalyse [kDa]	Kalkulation der molekularen Masse laut theoretischen Massen [kDa]
3 : 0	136,6	111
3 : 1	146,3	120,6
3 : 2	150	130,2
3 : 3	165,7	139,8
3 : 6	194,8	168,6
6 : 1	282,9	231,6
6 : 2	292,6	241,2
6 : 3	302,3	250,8
6 : 6	331,4	263,4

Hier konnte anhand einer zuvor durchgeführten Kalibrierung mit Hilfe eines Größenstandards die molekulare Masse der Proteine ungefähr berechnet werden. Die Kalkulation ergab für HTRA1 $\Delta$ mac eine molekulare Masse von 40,9 kDa für das Monomer und 136,6 kDa für das Trimer. Die theoretischen molekularen Massen betragen 37 kDa und 111 kDa. Für die RBD betrug die berechnete molekulare Masse 9,7 kDa bei einer theoretischen Masse von 9,6 kDa. Für die zwei Peaks mit Komplexen aus HTRA1 $\Delta$ mac und RBD wurden molekulare Masse von ca. 150,3 kDa und 281,1 kDa berechnet. Anhand der berechneten molekularen Massen aus den Einzelanalysen beider Proteine wurden mögliche Stöchiometrien des Komplexes kalkuliert (Tab. 4.1). Diese Kalkulation deutet am ehesten auf die Bindung von einem oder zwei Molekülen RBD an ein HTRA1 $\Delta$ mac Trimer hin (146,3 bzw. 150 kDa). Dazu passend entspricht der neu entstandene Peak nach gemeinsamer Inkubation (281,1 kDa) mathematisch am ehesten einem Komplex aus einem HTRA1 $\Delta$ mac Hexamer und ein oder zwei Molekülen RBD (282,9 kDa bzw. 292,6 kDa). Dies setzt allerdings voraus, dass die Bindung der RBD an HTRA1 die Bildung eines HTRA1 Hexamers induziert. Höhere Oligomere wurden für HTRA1 bereits auch in anderen Arbeiten beschrieben (Truebestein *et al.*, 2011). Da ein Monomer eines HTRA1 Trimers über den Loop LD mit dem Loop L3 des benachbarten Monomers interagieren kann, könnte die Bindung von einem Molekül RBD an ein HTRA1 Trimer ausreichen, um HTRA1 allosterisch zu regulieren. Wegen der geringen molekularen Masse der RBD von C-RAF ist die Genauigkeit dieser Berechnung allerdings kritisch zu betrachten. Die Analyse des Komplexes bedarf zu einer genauen Bestimmung der Stöchiometrie weiterer biochemischer und struktureller Untersuchungen wie beispielsweise nativer Massenspektrometrie oder Elektronenmikroskopie bzw. Proteinkristallisation.

Nachdem die Interaktion von HTRA1 und C-RAF bzw. der RBD von C-RAF in SW480 Zelllysaten und *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurde die Interaktion der RBD mit aktivem HTRA1 $\Delta$ mac und HTRA1 $\Delta$ PDZ untersucht. HTRA1 war dabei in der Lage die RBD von C-RAF PDZ abhängig in zwei kleinere Fragmente zu proteolysieren (Abb. 3.7). Die PDZ Domäne war also sowohl für die Interaktion beider Proteine, als auch für die Proteolyse der RBD entscheidend. Während die PDZ Domäne nicht für die Aktivierung von HTRA1 benötigt wird (Truebestein *et al.*, 2011), ist sie aber wichtig für die Spezifität der Protease. Neben einer spezifischen Erkennung der C-Termini von

Zielproteinen, wurde für die PDZ Domänen von HtrA Proteasen auch die spezifische Bindung interner Proteinsequenzen beschrieben (Sheng und Sala 2001). Dies wurde auch für die humanen Proteasen HTRA1 und HTRA3 berichtet. Dabei war die Bindung interner Sequenzen verglichen mit der Bindung C-terminaler Sequenzen jedoch weniger effizient (Runyon *et al.*, 2007).

#### 4.1.2. Die physiologische Bedeutung des HTRA1-C-RAF-Komplexes

Um eine mögliche Funktion der HTRA1-C-RAF-Interaktion zu analysieren, wurden die Proteinlevel von B-RAF und C-RAF, sowie die Aktivität des ERK-Signalweges in SW480 Zelllysaten untersucht. Die normalisierten B-RAF und C-RAF Proteinlevel waren in sh*HTRA1* Zellen leicht, jedoch nicht statistisch signifikant erhöht (Abb. 3.8A, B). Die Expression von B- und C-RAF war in allen getesteten SW480 Zelllinien vergleichbar (Abb. 3.8C). Anhand der experimentellen Daten dieser Arbeit lässt sich keine fundierte Aussage darüber treffen, ob C-RAF ein *in vivo* Substrat von HTRA1 darstellt. Auch eine Beeinflussung der Signalwegaktivität durch HTRA1 konnte unter keiner der getesteten Bedingungen eindeutig nachgewiesen werden (3.3.5). Eine mögliche Erklärung ist die Adaptation stabiler Zelllinien an die veränderte *HTRA1* Expression. Bereits andere Arbeiten zeigten eine Anpassung von Tumorzellen an genetische Veränderungen durch die Umgehung regulatorischer Mechanismen (Cairns und Mak 2017). Allerdings konnten auch nach Zugabe von rekombinantem HTRA1 $\Delta$ mac keine Veränderungen der Signalwegaktivität beobachtet werden (Abb. 3.20). Zusätzlich könnte eine Interaktion durch die Lokalisation beider Proteine innerhalb der Zelle oder durch andere zelluläre Interaktoren verhindert werden, die eine höhere Affinität für HTRA1 oder C-RAF aufweisen. Für HTRA1 kämen beispielweise Tubulin oder Tau in Frage, da für HTRA1 intrazellulär eine Lokalisation an Mikrotubuli beobachtet wurde (Chien *et al.*, 2009, Tennstaedt *et al.*, 2012, Poepsel *et al.*, 2015). C-RAF hingegen liegt zytoplasmatisch vor und wird bei Aktivierung durch RAS an die Zellmembran rekrutiert (Marais *et al.*, 1995).

Eine andere denkbare Funktion des Komplexes könnte die Phosphorylierung von HTRA1 durch die Kinasen des ERK-Signalweges sein. Für HTRA2 wurde eine Phosphorylierung durch den p38-Signalweg und die Kinase PINK1 beschrieben, die zu einer Steigerung der HTRA2 Aktivität führt (Beilina *et al.*, 2005). In Parkinson-Patienten wurde eine Mutation in PINK1 und eine reduzierte Phosphorylierung von



HTRA2 identifiziert, die scheinbar eine große physiologische Relevanz hat (Plun-Favreau *et al.*, 2007). Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob die Interaktion von HTRA1 und C-RAF Einfluss auf die Phosphorylierung von HTRA1 hat und welche physiologischen Auswirkungen eine mögliche differentielle Phosphorylierung zeigt.

## 4.2. Mögliche Funktionen von HTRA1 im Zellzyklus

Der Zellzyklus vereint die verschiedenen streng regulierten Prozesse, die eine Zelle durchlaufen muss, um sich zu teilen. Hierzu gehören das Zellwachstum, die Expression von Proteinen und die Reparatur von DNA (G1- und G2-Phase), die Verdopplung der zellulären DNA (S-Phase), sowie die Verteilung der Schwesterchromatiden auf beide Tochterzellen mit anschließender Zellteilung (M-Phase). Ein Übergang von einer Phase in die nächste wird durch die Aktivität von Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) und Cyclinen bestimmt (Hochegger *et al.*, 2008). Wenn der DNA-Gehalt der Zelle oder die Anzahl an Zentrosomen verändert, die DNA beschädigt ist oder die äußeren Wachstumsbedingungen der Zelle unzureichend sind, können Zellzykluskontrollpunkte zu einem Zellzyklusarrest bzw. einer DNA-Reparatur oder zu Apoptose führen (Hartwell und Weinert 1989, Zhou und Elledge 2000, Kastan und Bartek 2004). Eine Deregulierung von Zellzykluskontrollpunkten steht mit einem unkontrollierten Wachstum der Zellen und so mit der Entstehung von Krebs in Verbindung (Kastan und Bartek 2004).

Eine negative Regulation des humanen *HTRA1* Gens fördert die Proliferation und Migration von Tumorzellen, sowie die Resistenz gegenüber Cisplatin- und Paclitaxel-induzierter Zytotoxizität (Baldi *et al.*, 2002, Chien *et al.*, 2004, Chien *et al.*, 2006). Zusätzlich führt ein Verlust von Htra1 in primären Mausfibroblasten zu einer verspäteten Seneszenz, einer Amplifikation von Zentrosomen und zu Polyploidie (Schmidt *et al.*, 2016). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass HTRA1 eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen könnte. Um Informationen über die Rolle von HTRA1 in spezifischen Zellzyklusphasen zu sammeln und potentielle Interaktoren von HTRA1 zu identifizieren, wurde eine Proteom Analyse mit synchronisierten SW480 Zellen durchgeführt (3.5). Innerhalb dieser Analyse konnten 5639 Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Level von 4723 dieser Proteine schwankten in Abhängigkeit des Zellzyklus, 2872 in Abhängigkeit von HTRA1 und 1530 in Abhängigkeit von beiden Variablen (Abb. 3.30). Während die Anzahl

zellzyklusregulierter Proteine mit den Ergebnissen anderer Arbeiten vergleichbar war (Singh *et al.*, 2014), war die Anzahl jener Proteine, die HTRA1 reguliert waren, erstaunlich hoch. Dies deutet auf eine Rolle von HTRA1 in der Erhaltung der zellulären Proteinhomöostase hin. Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass HtrA Proteasen wichtige Aufgaben im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle übernehmen und eine der 16 evolutionär hoch konservierten Proteasefamilien darstellen (Page und Di Cera 2008, Clausen *et al.*, 2011). Darüber hinaus fluktuierte etwa die Hälfte der Proteine, deren Level in Abhängigkeit von HTRA1 schwankten, auch in Abhängigkeit des Zellzyklus. Diese Korrelation deutet erneut darauf hin, dass HTRA1 am Zellzyklus oder an dessen Regulation beteiligt ist.

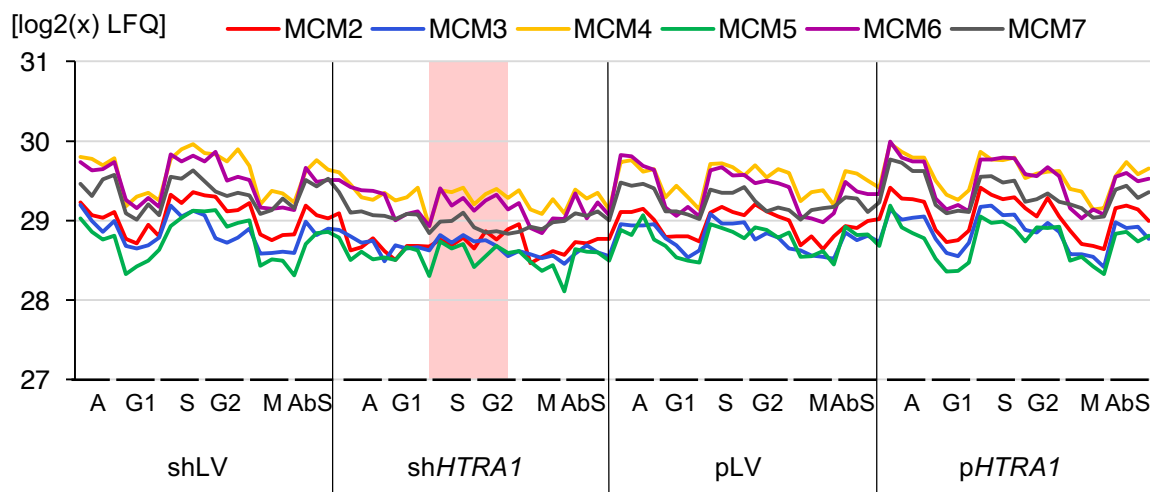
Die experimentellen Daten lassen vermuten, dass einer oder mehrere Zellzykluskontrollpunkte in shHTRA1 Zellen in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Diverse Proteine, die mit der Funktion von Zellzykluskontrollpunkten assoziiert sind, waren in diesen Zellen mit vermindertem HTRA1 Gehalt stärker abundant und wurden gleichzeitig in PD Experimenten mit HTRA1 identifiziert<sup>16</sup> (Tab. 3.7) (Schillinger *et al.*, *submitted*). Am prominentesten betraf dies Proteine, die mit dem G2-DNA damage checkpoint bzw. der Transition von G2- zu M-Phase und dem SAC bzw. der M-Phase Transition in Verbindung stehen (Tab. 3.7). Da MAP7D1 das einzige dieser Proteine war, dessen Level invers mit dem HTRA1 Level korrelierte und gleichzeitig im PD mit HTRA1 identifiziert wurde, wird MAP7D1 im Rahmen dieser Arbeit als neues potentiell HTRA1 Substrat postuliert. Auch der C-Terminus von MAP7D1 deutet auf eine Interaktion mit HTRA1 hin, da die 4 C-terminalen Aminosäuren ein PDZ-Bindemotif darstellen (TEVL) (Runyon *et al.*, 2007). Das Protein MAP7D1 (*microtubule-associated protein 7 domain containing 1*) ist ein Mikrotubuli assoziiertes Protein, dessen genaue Funktion unbekannt ist. Neben MAP7D1 beeinflusste die Abundanz von HTRA1 auch invers die Level von anderen Proteinen, die an der Organisation des Zytoskeletts und Mikrotubuli basiertem Transport beteiligt sind. Dazu gehören 11 Tubulin Isoformen, Tubulin spezifische Chaperone (TBCD und TBCE) und Teile des Dynactin/Dynein Proteinkomplexes (DCTN5 und DYNLT1) (Tab. 3.3). Darüber hinaus waren die GOBP-terms "*microtubule cytoskeleton organization*" und

---

<sup>16</sup> Die *Pulldown* Experimente wurden von Katharina Severin durchgeführt (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland). Die Messung der Proben mittels LC-MS und Identifikation der Peptide mit der MaxQuant Software erfolgte durch Dr. Farnusch Kaschani (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland). Die Auswertung der *Pulldown* Experimente sowie der Abgleich der Ergebnisse mit dem Proteom-Datensatz erfolgte mit Erlaubnis von Katharina Severin.

“*post-chaperonin tubulin folding pathway*” unter den HTRA1 invers korrelierenden Proteinen angereichert. Die Ergebnisse der Proteom Analyse deuten deshalb auf eine Rolle von HTRA1 im *G2-DNA damage checkpoint*, in der korrekten Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts sowie der Chromosomensegregation hin.

Um mehr Informationen über die Rolle von HTRA1 in der S-Phase zu erhalten, wurden die Abundanzprofile von Proteinen analysiert, die an der DNA-Replikation beteiligt sind. Dabei konnten alle Komponenten des MCM (*Minichromosome maintenance*) Komplexes (MCM2 - 7) identifiziert werden, der essentiell für die DNA Replikation ist (Bleichert *et al.*, 2017). Die sechs MCM Proteine sind AAA-ATPasen, die ein hetero-oligomeres Hexamer, bestehend aus allen sechs MCM Proteinen, bilden (Davey *et al.*, 2003). Neben der ATP hydrolytischen Aktivität stellt der Komplex aus den MCM Proteinen vermutlich die replikative Helikase in Eukaryoten dar (Ishimi 1997). Darüber hinaus wird dem Proteinkomplex eine wichtige Rolle im Prozess des DNA *Licensing* zugeschrieben (Prokhorova und Blow 2000, Schwacha und Bell 2001), der essentiell für eine korrekte Replikation der DNA ist. *Licensing* Faktoren wie der MCM-Komplex kontrollieren dabei, dass an jedem Replikationsursprung (*origin of replication*) nur ein Mal pro Zellzyklus die DNA Replikation gestartet wird.



**Abb. 4.1 Abundanzprofil von MCM Proteinen über den Zellzyklus**

Dargestellt sind die  $\log_2(x)$  LFQ-Intensitäten aller 96 Proben für die Proteine MCM2-7, die im Rahmen der DNA-Replikation ein hetero-oligomeres Hexamer bilden. Dargestellt sind ausschließlich Werte aus dem nicht-imputierten Datensatz. Jede Bedingung ist in Quadruplikaten repräsentiert.

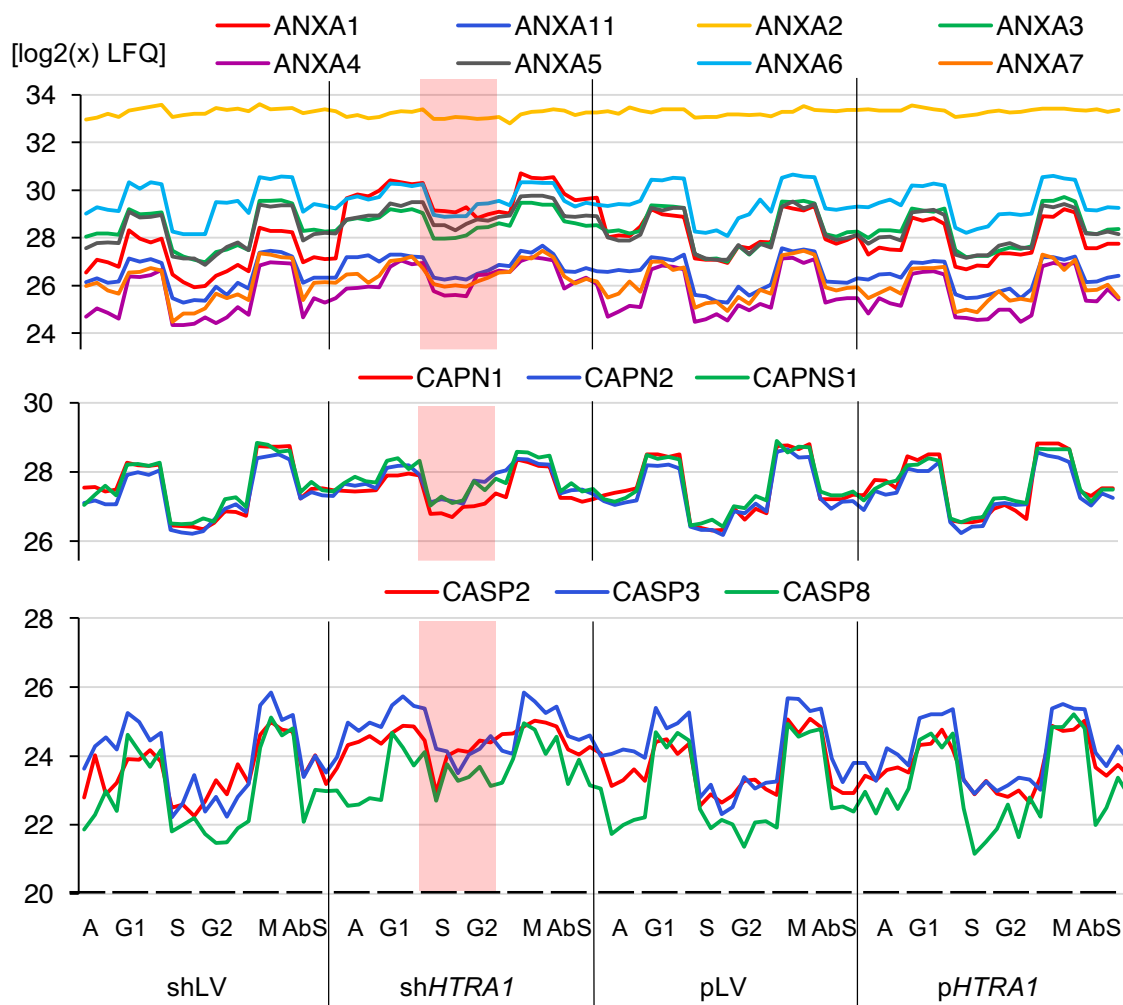
Die Level aller MCM Proteine waren während M- und G1-Phase niedriger als in S- und G2-Phase bzw. den asynchronen Kontrollen und zeigten somit eine bisher unbekannte zellzyklusabhängige Abundanz (Abb. 4.2). In M- und G1-Phase waren die Proteinlevel in shHTRA1 Zellen signifikant weniger abundant als in shLV Zellen und zeigten keine zellzyklusabhängige Fluktuation. In früheren Arbeiten konnte ein Verlust der Aktivität bzw. eine Reduktion der Proteinlevel des MCM-Komplexes mit DNA Schädigungen und Genominstabilität korreliert werden (Bailis und Forsburg 2004). Eine Instabilität des Genoms mit einer daraus resultierenden Polyploidie wurde bereits zuvor für die verwendeten shHTRA1 SW480 Zellen beschrieben (Schmidt *et al.*, 2016). Die Beobachtung, dass die MCM Level in Abwesenheit von HTRA1 abnahmen, spricht gegen eine Theorie von MCMs als HTRA1 Substraten. Die C-Termini von MCM3, 4 und 7 (IFLI, VRLL und ITFV) enthalten jedoch Bindemotive für die PDZ Domäne von HTRA1. Es liegt daher nahe zu spekulieren, dass ein MCM-HTRA1-Komplex die MCM Proteine vor einem Abbau durch andere Proteasen schützen könnte.

Um die genauen Rolle von HTRA1 in der Regulation des Zellzyklus mechanistisch zu bestimmen, sind weitere Arbeiten notwendig. Eine Beteiligung von HTRA1 an der Regulation von Zellzykluskontrollpunkten und der DNA-Replikation scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit sehr wahrscheinlich. Eine gezielte Inhibition von Zellzykluskontrollpunkten und die Analyse lebender Zellen mittels CLSM sowie die Analyse des Phospho-Proteoms der verwendeten SW480 Zellen könnte hierbei weitere Aufschlüsse über die beteiligten Signalwege geben.

### **4.3. Mögliche Funktionen von HTRA1 im programmierten Zelltod**

In der durchgeführten Proteom-Analyse (3.5) wurde ein Set von Proteinen identifiziert, das eine erhöhte Abundanz in shHTRA1 Zellen zeigte und eine Reihe von Faktoren enthielt, die an der Regulation von programmiertem Zelltod bzw. Apoptose beteiligt sind (Tab. 3.1). Der prominenteste HTRA1 regulierte Hit aus der Gruppe der Apoptose-assoziierten Proteine war Annexin A1 (ANXA1, auch: Lipocortin I). Annexin A1 gehört zur Familie der Annexine, die zu den Calcium-bindenden Proteinen gehört. Annexine sind in der Lage, Calcium abhängig an negativ geladene Phospholipide zu binden (Donnelly und Moss 1997) und trimere Strukturen auszubilden (Oling *et al.*, 2000). Für Annexine wurden diverse Funktionen in Membran-assoziierten Prozessen wie der Endo- und Exozytose, als Membran-Anker und in der Membranorganisation aber auch

in anderen Prozessen wie der Blutgerinnung, Entzündungen und der Apoptose beschrieben (Creutz 1992, Emans *et al.*, 1993, Harder und Gerke 1993, Gerke und Moss 1997, Arur *et al.*, 2003, Forman *et al.*, 2004, Kenis *et al.*, 2004, Rescher und Gerke 2004, Gerke *et al.*, 2005). Mit apoptotischen Prozessen wurde Annexin A1 in Verbindung gebracht, weil die Überexpression des *ANXA1* Gens in monozytischen Zellen zu einer erhöhten Caspase-3 Aktivität und so zu einer erhöhten Apoptose führte (Solito *et al.*, 2001). Zusätzlich ist Annexin A1 in der Lage, in Neutrophilen pro-apoptotische Prozesse zu stimulieren, welche vermutlich über eine Dephosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins BAD vermittelt werden (Solito *et al.*, 2003). In Jurkat Lymphozyten dient Annexin A1 als extrazellulärer Marker



**Abb. 4.2 Abundanzprofil ausgewählter Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren**

Dargestellt sind die  $\log_2(x)$  LFQ-Intensitäten aller 96 Proben für ausgewählte Proteingruppen, die mit der Regulation von Zellzyklus und Apoptose in Verbindung stehen. Dargestellt sind ausschließlich Werte aus dem nicht-imputierten Datensatz. Jede Bedingung ist in Quadruplikaten repräsentiert. Zur Bezeichnung der Proteine wurden die Gennamen verwendet.

für die Phagozytose apoptotischer Zellen (Arur *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Annexin A1 Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie oder Zytostatika-Behandlung sensibilisieren aber auch, dass Annexin A1, A2 und A3 die Resistenz von Lungenkrebs-Zellen gegenüber einer Cisplatin-Behandlung fördern können (Wang *et al.*, 2014, Huang *et al.*, 2016).

Die unterschiedlichen Level von Annexin A1 in den vier SW480 Zelllinien wurden in einer Western-Blot Analyse verifiziert (Abb. 3.30B). Eine Analyse des Abundanzprofils über den Zellzyklus zeigte auch hier eine zellzyklusabhängige Veränderung (Abb. 4.2). Die Level waren in der G1- und M-Phase höher als in der S- und G-Phase. In shHTRA1 Zellen waren die Annexin A1 Level in allen Zellzyklusphasen konstant höher als in den anderen Zelllinien. Die Reduktion des Annexin A1 Levels in S- und G2-Phase war in shHTRA1 Zellen deutlich weniger stark ausgeprägt. In einem Enzym-Assay mit den rekombinanten Proteinen wurde Annexin A1 vollständig durch HTRA1 $\Delta$ mac proteolysiert (Abb. 3.32). Diese Ergebnisse identifizieren Annexin A1 als bisher unbekanntes HTRA1 Substrat.

Der Proteom-Datensatz wurde auch auf andere Proteine durchsucht, die ein ähnliches Abundanzprofil zeigten und auch mit der Regulation apoptotischer Prozesse in Verbindung stehen. Außer Annexin A2 (ANXA2) zeigten alle anderen Annexine, die in diesem Datensatz gefunden wurden, die Caspasen 2, 3 und 8, sowie die Calpaine (CAPN) 1 und 2 und die kleine regulatorische Calpain Untereinheit (CAPN1S1) ein sehr ähnliches Abundanzprofil über den Zellzyklus wie Annexin A1 (Abb. 4.2B). Auch hier konnte eine Deregulierung der Proteinlevel in S- und G2-Phase in shHTRA1 Zellen beobachtet werden. Calpaine sind Calcium abhängige Proteasen, die zur Klasse der Cysteinproteasen gehören und hoch konserviert sind (Guroff 1964, Marchler-Bauer *et al.*, 2009). Die hier identifizierten klassischen Calpaine 1 und 2 (CAPN1/2) bilden mit der kleinen regulatorischen Untereinheit CAPN1S1 ein funktionales Heterodimer. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass rekombinant gereinigtes HTRA1 und Calpain 2 *in vitro* über die PDZ-Domäne von HTRA1 interagieren und dass HTRA1 durch Calpain 2 allosterisch aktiviert werden kann (Dissertation Maike Breiden, unveröffentlichte Daten Juliana Rey). Sowohl für Annexine als auch für Calpaine wurden bislang pro- und anti-apoptotische Funktionen beschrieben. Für Calpaine wurde beobachtet, dass sie p53 proteolysieren und so p53-vermittelte Apoptose inhibieren (Gonen *et al.*, 1997, Kubbutat und Vousden 1997,

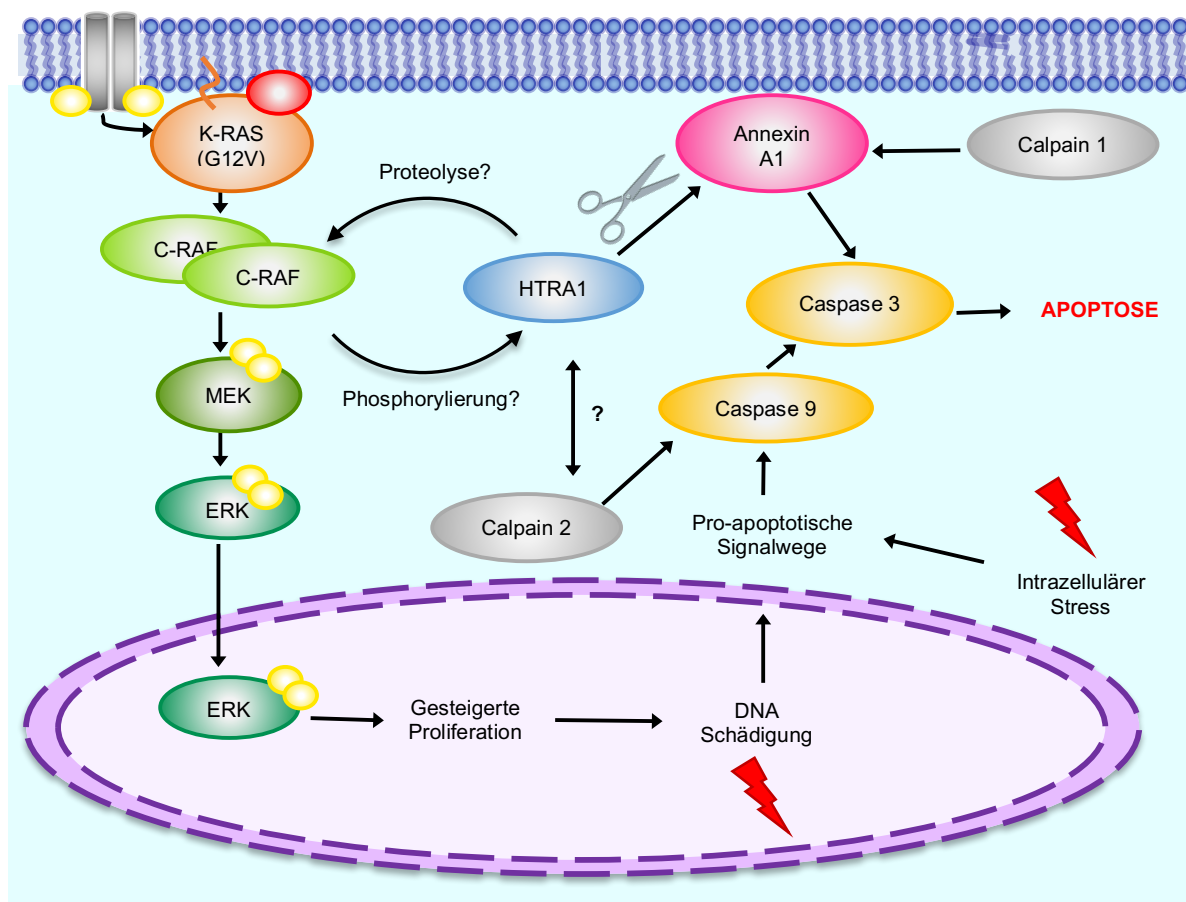
Woo *et al.*, 2012). Gleichzeitig war eine erhöhte Expression von Calpain 2 in Ovarialkarzinomen mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cisplatin assoziiert (Storr *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass Calpain 2 die Caspasen 7, 9, 10 und 12 prozessieren und aktivieren kann. Für beide Proteinfamilien wurde aber bislang keine zellzyklusabhängige Regulation beschrieben. Interessanterweise prozessiert Calpain 1 *in vitro* die N-terminale Domäne von Annexin A1. Dies führt zu einer erhöhten Calciumsensitivität von Annexin A1 und so zu einer erhöhten Aktivierung der Caspase-3 (Ando *et al.*, 1989, Barnes und Gomes 2002, Solito *et al.*, 2003). Diese Arbeiten deuten insgesamt auf eine Interaktion von Calpain 1, Annexin A1 und Caspase-3 im Rahmen einer Caspase vermittelten Apoptose hin. Dass alle drei Proteine in S- und G2-Phase in shHTRA1 Zellen stärker abundant waren lässt auf eine bisher unbekannte Rolle von HTRA1 in Annexin- und Caspase-vermittelter Apoptose in SW480 Zellen schließen.

In den vier SW480 Zelllinien wurden tote Zellen mit dem sogenannten „Nicoletti-Verfahren“ quantifiziert (Nicoletti *et al.*, 1991). shHTRA1 Zellen zeigten die größte Menge toter Zellen (Abb. 3.33D). Ursache hierfür könnte das gemessene erhöhte Level von Annexinen, Calpainen und Caspasen sein. Um festzustellen, ob es sich bei der beobachteten Form des induzierten Zelltodes um eine Caspase abhängige Form handelt, wurden die Zellen mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPh Hydrat (Q-VD) behandelt. Q-VD reduzierte die Fraktion toter Zellen im Vergleich zu den DMSO Kontrollen signifikant um 3 – 6 %. Die stärkste Reduktion um ca. 6 % war in shHTRA1 Zellen zu beobachten. Die Menge toter Zellen in shHTRA1 war unter diesen Bedingungen vergleichbar mit der Menge toter Zellen in der Kontrolle. Der beobachtete HTRA1 abhängige Unterschied zwischen diesen beiden Zelllinien basierte somit auf einem Caspase abhängigen Zelltod. In vorherigen Arbeiten wurde bisher jedoch nur beschrieben, dass HTRA1 eine pro-apoptotische Rolle in Caspase unabhängiger Apoptose spielt (Chien *et al.*, 2004) oder die Caspase abhängige Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-3 und 7 induziert (Chien *et al.*, 2006). In Zellen des retinalen Pigmentepithels führte ein *Knockout* des HTRA1 Gens außerdem zu einer Inhibition der Apoptose durch die verminderte Expression von pro-apoptotischem Bax und Caspase-3, sowie einer erhöhten Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 (Yu *et al.*, 2017).

In einem weiteren Experiment wurden die Zellen mit 5-FU, einem DNA schädigenden Agens, behandelt. 5-FU führte in allen Zelllinien signifikante Induktion von Zelltod (Abb. 3.34). Die Induktion von Zelltod mittels 5-FU war in sh*HTRA1* Zellen deutlich stärker als in den anderen Zelllinien. Da 5-FU DNA Schäden induziert, handelt es sich bei der betrachteten Form des Zelltodes um intrinsisch aktivierte Signalwege. Eine gleichzeitige Gabe von Q-VD reduzierte den Anteil toter Zellen in allen Zelllinien außer p*HTRA1* signifikant. Der Anteil toter Zellen war in sh*HTRA1* Zellen trotzdem signifikant höher als in den anderen Zelllinien. Auch wenn dieser Unterschied durch die Gabe von Q-VD reduziert werden konnte, konnte der HTRA1 abhängige Effekt in der Induktion des Zelltodes nicht vollständig aufgehoben werden. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte durch die 5-FU induzierte Schädigung der zellulären DNA auch ein großer Teil Caspase unabhängigen Zelltodes induziert worden sein. Zum anderen könnte eine längere Behandlung mit 5-FU und Q-VD artifiziell eine Sekundärnekrose induziert haben (Silva 2010). Es wäre daher interessant, die Beteiligung von HTRA1 in Prozessen der Caspase unabhängigen Apoptose bzw. Nekrose oder Nekroptose genauer zu untersuchen.

Um auch den Einfluss des ERK-Signalweges auf den Zelltod in SW480 Zellen zu überprüfen, wurden die SW480 Zellen in einem zweiten Experiment mit einem MEK-Inhibitor behandelt (Abb. 3.34). Eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit 5-FU und MI über führte zu einer signifikanten Reduktion der Zelltodinduktion verglichen mit der Gabe von 5-FU alleine. Der zuvor beobachtete, signifikante Unterschied in der Anzahl toter Zellen zwischen sh*HTRA1* Zellen und den anderen Zelllinien wurde durch den MI vollständig aufgehoben. Die erhöhte Sensitivität von sh*HTRA1* Zellen gegenüber 5-FU scheint also neben dem HTRA1 Verlust durchaus mit der konstitutiven Aktivität des ERK-Signalweges in SW480 Zellen und vermutlich auch mit deren erhöhter Proliferationsrate zusammenzuhängen. Jedoch konnte zwischen den beiden Vorgängen innerhalb dieser Arbeit mechanistisch kein Zusammenhang entdeckt werden. Nach den experimentellen Daten dieser Arbeit ist wahrscheinlicher, dass HTRA1 durch die Interaktion mit Annexin A1 Einfluss auf den Prozess der Caspase abhängigen Apoptose nimmt (Abb. 4.3). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei der erhöhten Apoptose in sh*HTRA1* Zellen viel mehr um einen additiven Effekt der K-RAS(G12V) Mutation und des HTRA1 Verlustes handelt, der von den Kolonkarzinomzellen nicht toleriert werden kann. Eine Akkumulation dieser





**Abb. 4.3 Modell zur möglichen Funktion von HTRA1 in der intrinsischen Apoptose.**

Schematische dargestellt ist eine mögliche Funktion von HTRA1 in den Signalwegen der intrinsischen Apoptose. Modifiziert nach Ando *et al.*, 1989, Barnes und Gomes 2002, Solito *et al.*, 2003, Dissertation Maïke Breiden. HTRA1 (blau) interagiert mit C-RAF (grün). Die C-RAF-RBD ist ein *in vitro* Substrat von HTRA1. Ein Effekt auf die Aktivität des ERK-Signalweges konnte nicht beobachtet werden. Eine Regulation von HTRA1 mittels Phosphorylierung durch Kinasen des ERK-Signalweges wäre denkbar, da für HTRA2 eine Regulation durch die Kinase PINK1 beschrieben wurde (Plun-Favreau *et al.*, 2007). Annexin A1 (pink) ist ein HTRA1 Substrat. Ist die Proteolyse von Annexin A1 durch HTRA1 reduziert, beispielsweise in *shHTRA1* Zellen, könnte es durch erhöhte Annexin A1 Level zu einer gesteigerten Caspase-3 (gelb) Aktivität kommen. Zusätzlich sind in S- und G2-Phase die Level von Calpain 1 und 2 (grau), sowie der Caspasen-2, -3 und -8 erhöht. Calpain 1 prozessiert die N-terminale Domäne von Annexin A1 und steigert über eine erhöhte Calcium-Sensitivität zusätzlich die Annexin A1 Aktivität. Calpain 2 prozessiert und aktiviert diverse Caspasen, wie beispielsweise die Initiatorcaspase-9. Frühere Arbeiten zeigten die Bildung eines HTRA1-Calpain-2-Komplexes. Calpain 2 steigerte dabei die HTRA1 Aktivität (Dissertation Maïke Breiden). Der Effekt deiner Komplexbildung auf die Initiation intrinsischer Apoptose müsste näher untersucht werden. Insgesamt würde ein HTRA1 Verlust nach diesem Modell zu einer erhöhten Rate Caspase-abhängiger Apoptose führen. Die gesteigerte Proliferation der Zellen, beispielsweise durch einen konstitutiv aktiven ERK-Signalweg, führt zu Polyploidie und Zentrosomen-Amplifikation (Schmidt *et al.*, 2016) und könnte so die Initialisierung intrinsischer Apoptose begünstigen.

Veränderungen könnte auch in den Zellen der intestinalen Neoplasien und Tumoren der Mäuse zu einer erhöhten Apoptose geführt haben. Dies würde erklären, warum der *Knockout* von *Htra1* oder die *K-ras(G12V)* Mutation alleine in den *in vivo* Experimenten (Abb. 3.1) nicht ausreichte, um eine Veränderung der Überlebensrate der Mäuse zu beobachten. Um diese Theorie zu bestätigen, müsste eine histologische Untersuchung der Tumore bezüglich apoptotischer Marker, sowie eine Bestimmung der Tumorgroße durchgeführt werden.

#### **4.4. HTRA1 als zellulärer Transporter**

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Proteingehalt einer Zelle zu manipulieren. Durch das Einbringen von Expressionsplasmiden mittels Transfektionsreagenz können Proteine gezielt in Zellen produziert werden. Die klinische Anwendung einer solchen genetischen Manipulation ist bis heute nicht möglich. Mit Hilfe von Nanopartikeln oder zellgängigen Peptiden können Proteine in humane Zellen transportiert werden (Bechara und Sagan 2013, Rotan *et al.*, 2017). Diese Techniken weisen jedoch eine geringe Effizienz und oftmals zytotoxische Effekte auf. Außerdem kann das Zielprotein durch Anbindung an diese Transporter eventuell seine Aktivität verlieren. Die Aufnahme dieser Transporter über das endosomale System stellt einen limitierenden Faktor dar, der die zelluläre Bioverfügbarkeit der Zielproteine einschränkt (Shete *et al.*, 2014).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte Western-Blot Analyse und CLSM gezeigt werden, dass rekombinant gereinigtes HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA) ein fusioniertes Zielprotein spontan in humane Zellen transportieren kann (Abb. 3.24, Abb. 3.25). Hierzu wurde das Fusionsprotein zunächst kloniert und gereinigt (3.4). Als Zielprotein wurde in diesem Fall eGFP verwendet. Die Integrität des Zielproteins eGFP wurde vor und nach der Aufnahme in SW480 Zellen durch Messung der Fluoreszenz überprüft. Die experimentellen Daten deuten außerdem darauf hin, dass eGFP innerhalb der Zelle vom Fusionsprotein abgespalten wird. Die Lokalisation in der Zelle war zytoplasmatisch und nukleär.

Der genaue Mechanismus der HTRA1 Aufnahme in humane Zellen ist nicht bekannt und muss weiter aufgeklärt werden. Trotzdem könnte HTRA1 eine neuartige Möglichkeit für den Transport von z.B. therapeutischen Proteinen in humane Zellen

darstellen. Da HTRA1 ein natürlich vorkommendes Protein humaner Zellen ist, wären die Nebenwirkungen bei klinischer Anwendung vermutlich geringer als bei der Verwendung körperfremder Substanzen. Zusätzlich zeigt HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA) in den verwendeten Konzentrationen keine zytotoxischen Eigenschaften. Da die verwendete HTRA1 Variante proteolytisch inaktiv ist, könnten auch durch die Proteasefunktion keine Nebeneffekte auftreten. Die Interaktion von HTRA1 $\Delta$ PDZ(SA) mit anderen Proteinen in der Zelle ist durch die fehlende PDZ-Domäne zusätzlich eingeschränkt. Die hier durchgeführten Experimente zeigen außerdem, dass es möglich ist, Zielproteine innerhalb der Zelle vom Fusionsprotein abzuspalten. Das zusätzliche Einfügen der Schnittstelle einer anderen ubiquitären humanen Protease, könnte zu einer nahezu vollständigen Freisetzung des Zielproteins in der Zelle führen. Darüber hinaus könnten möglicherweise auch PDZ Liganden ohne Fusionierung durch HTRA1 $\Delta$ mac(SA) in die Zelle transportiert werden und dort von HTRA1 abdiffundieren. Die Sequenz der PDZ Domäne könnte dann gezielt so verändert werden, dass sie spezifisch das Zielprotein erkennt (Luck *et al.*, 2012, Teyra *et al.*, 2012). Fraglich ist jedoch ob die Interaktion zwischen HTRA1 und Ligand stabil genug für einen Transport in die Zelle wäre. Auch der Transport von Inhibitoren eines Zielproteins ist theoretisch möglich.

#### **4.5. Oligomerisierungsdefekte führen zu einem Verlust der proteolytischen Aktivität klinisch relevanter HTRA1 Mutanten**

Die Erbkrankheit CARASIL wird durch Mutationen im *HTRA1* Gen ausgelöst, die zu einem Funktionsverlust der Protease führen (Hara *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Effekt von fünf klinisch relevanten HTRA1 Mutationen auf die Aktivität und den oligomeren Zustand von HTRA1 untersucht. Eine Computer-basierte Strukturanalyse<sup>17</sup> zeigte, dass die Aminosäure A252 gemeinsam mit anderen bekannten mutierten Aminosäuren wie V297, P285 und A321 vermutlich an der korrekten Faltung des aktiven Zentrums beteiligt ist (Abb. 3.36A). Die Aminosäuren R166, A173, R274 und G295 hingegen liegen im Interaktionsbereich der Monomere innerhalb des HTRA1 Trimers (Abb. 3.36B). Alle HTRA1 Mutanten<sup>18</sup> zeigten eine

---

<sup>17</sup> Die Computer-basierte Strukturanalyse der HTRA1 Mutanten wurde von Dr. Kenny Bravo Rodriguez (Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland) durchgeführt.

<sup>18</sup> Die Experimente wurde von Kirsty Greenow, Alan R. Clarke und Kollegen (Cardiff University, Cardiff, UK) durchgeführt

teilweise oder vollständige Reduktion der proteolytischen Aktivität (Abb. 3.37). Diese experimentellen Daten bestätigen eine reduzierte Aktivität von HTRA1 als einen essentiellen Faktor im Rahmen der CARASIL Erkrankung (Hara *et al.*, 2009). Außerdem bestätigten sie, dass auch Mutationen, die nicht innerhalb der Proteasedomäne liegen, zu einem Aktivitätsverlust von HTRA1 führen können. Dieser Aktivitätsverlust ging bei Mutationen aus dem Trimer-*Interface* mit einem Verlust der trimeren Struktur von HTRA1 einher (Abb. 3.39, Abb. 3.40). Dazu passend sagte eine weitere Computer-basierte Analyse (*molecular dynamics simulations and free energy calculations*) für die Mutationen R166H, A173T und R274Q eine Destabilisierung des HTRA1 Trimers voraus (persönliche Kommunikation Dr. Kenny Bravo Rodriguez).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass HTRA1 ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung einer Protein basierten Therapie bei CARASIL darstellt. Die proteolytische Aktivität von HTRA1(R166H) konnte durch Zugabe des CfD-Peptides teilweise wiederhergestellt werden. Die hier beobachtete Wiederherstellung der proteolytischen Aktivität kann theoretisch über verschiedene Mechanismen erfolgen. Zum einen könnte die Bindung des CfD Peptides an die PDZ-Domäne zu einer allosterischen Aktivierung von monomerem HTRA1(R166H) führen. Es besteht zum anderen die Möglichkeit, dass das Peptid durch eine Bindung an die PDZ- oder Proteasedomäne zu einer erneuten Assemblierung des Trimers und so zu einer Erhöhung der Aktivität führt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, müssten sowohl die Interaktion von HTRA1 und CfD-Peptid als auch der oligomere Zustand der Protease überprüft werden.

Theoretisch ist es möglich, die Aktivität von HTRA1 durch eine Reparatur der trimeren Struktur vollständig wiederherzustellen. Andere Arbeiten zeigen, dass die Assemblierung des HTRA1 Trimers ein dynamischer Prozess ist (Masterarbeit Jasmin Nelles). Eine gemeinsame Inkubation verschiedener HTRA1 Varianten, resultierte laut einer nativen massenspektrometrischen Analyse in der Entstehung gemischter HTRA1 Trimere (Ehrmann *et al.*, *submitted*). Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch inaktives HTRA1(S328A) dazu in der Lage ist, die Aktivität von mutiertem HTRA1 durch eine Reparatur der trimeren Struktur wiederherzustellen (persönliche Kommunikation Dr. Nathalie Beaufort). Diese Art der Proteinreparatur hätte durch die fehlende Aktivität zugeführter Proteine, vermutlich nur geringe Nebenwirkungen. Darüber hinaus wäre denkbar, gezielt niedermolekulare Verbindungen zu designen,

---

die die Assemblierung des HTRA1 Trimers stabilisieren. Eine solche Proteinreparatur wäre allgemein anwendbar auf alle monogenetische Erkrankungen, die durch Assemblierungsdefekte oligomerer Proteine verursacht werden. Dass dieses neue Feld der Proteinreparatur von großer Bedeutung ist, wurde am Beispiel eines defekten CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductor receptor*) gezeigt (Schwank *et al.*, 2013). Durch Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems konnte in adulten Stammzellen aus Patienten mit zystischer Fibrose, die Funktion des Rezeptors wiederhergestellt werden. Der Ansatz, mutiertes HTRA1 aus CARASIL Patienten mittels supramolekularer Chemie zu reparieren, hat das Potential einen wesentlichen Beitrag zu diesem Feld zu leisten und es um wertvolles Wissen zu erweitern.

## 5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte C-RAF als neuer Interaktionspartner der humanen Serinprotease HTRA1 identifiziert werden. Dabei wurde eine Interaktion von HTRA1 und C-RAF in SW480 Zelllysaten und die Bildung eines Komplexes aus HTRA1 $\Delta$ mac und der C-RAF-RBD *in vitro* nachgewiesen. Die C-RAF-RBD ist außerdem ein *in vitro* Substrat von HTRA1. Eine Interaktion von HTRA1 und C-RAF scheint laut konfokaler Lasermikroskopie möglich. Für eine genauere Untersuchung einer Kolo-kalisation beider Proteine mittels konfokaler Lasermikroskopie könnte der FRET-FLIM oder ein GFP-Split-System verwendet werden. Zusätzlich sollten die *in vitro* Untersuchungen zur HTRA1 C-RAF Interaktion mit vollständigem C-RAF wiederholt werden. Dieses könnte beispielweise rekombinant in einer Insektenzellkultur exprimiert und gereinigt werden. Interessant wäre bei Bildung eines stabilen Komplexes die genauere Untersuchung von Stöchiometrie und Struktur z.B. mittels Kristallisation oder *Cryo-EM*. In Zell-basierten Studien konnte dagegen unter den gewählten Bedingungen kein Einfluss auf die Aktivität des ERK-Signalweges beobachtet werden. Eine sensitivere Möglichkeit die Aktivität des ERK-Signalweges zu bestimmen, wäre eine Analyse des Phospho-Proteoms mittels quantitativer Massenspektrometrie. Darüber hinaus sollte auch die Phosphorylierung von HTRA1 unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden, um festzustellen ob die Kinasen des ERK-Signalweges Einfluss auf die Phosphorylierung und Aktivität von HTRA1 haben. Diese Informationen würden wichtige Erkenntnisse über die allgemeine Regulation von HTRA1 liefern.

Des Weiteren wurde auch Annexin A1 als neues HTRA1 Substrat identifiziert. Genau wie mit C-RAF wäre eine detaillierte Untersuchung der HTRA1 Annexin A1 und eventuell Calpain 1 Interaktion *in vivo* und *in vitro* interessant. Diese Untersuchungen könnten wichtige Einblicke in die Funktion von HTRA1 im Rahmen des programmierten Zelltodes und der Krebsentstehung geben. Allgemein sollen die hier dargestellten Ergebnisse genutzt werden, um die Rolle von HTRA1 in regulatorischen Prozessen der Zelle mechanistisch zu untersuchen. Die experimentellen Daten der Proteom-Analyse liefern viele neue Ansatzpunkte für mögliche HTRA1 regulierte Proteine und Prozesse. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge könnte HTRA1 auch als Angriffsziel medikamentöser Therapien oder als Marker für bestimmte Erkrankungen qualifizieren.

Im Zuge dieser Dissertation wurde HTRA1 außerdem als zellulärer Transporter für andere Proteine charakterisiert. Die experimentellen Daten der Western Blot-Analyse und der konfokalen Lasermikroskopie zeigen, dass HTRA1 in humane Zellen aufgenommen werden kann. HTRA1 kann dabei ein fusioniertes Protein, hier eGFP, in die Zelle transportieren, welches in der Zelle dann teilweise vom Fusionsprotein abgespalten wird. Die Funktionalität des Zielproteins blieb dabei erhalten. HTRA1 könnte deshalb theoretisch in klinischen Anwendungen von Bedeutung sein, um ein Zielprotein ohne chemische oder genetische Manipulation in humane Zellen einzubringen. Der genaue Mechanismus der HTRA1 Aufnahme müsste allerdings zunächst mechanistisch aufgeklärt werden. Zusätzlich müsste auch die Bioverfügbarkeit des Zielproteins in den Zellen bestimmt werden. Darüber hinaus ist zu untersuchen, ob HTRA1 Proteine jeder Größe und Ladung in die Zelle transportieren kann.

Die Aufnahme von HTRA1 in humane Zellen könnte auch für die Behandlung von CARASIL von Bedeutung sein. Da ein Verlust der HTRA1 Aktivität, soweit bekannt, der Auslöser dieser monogenetischen Erkrankung ist, ist HTRA1 das einzige logische Ziel für die Entwicklung einer CARASIL Therapie. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein Verlust der trimeren Struktur von vier CARASIL relevanten HTRA1 Mutanten, zu einem Verlust der HTRA1 Aktivität führt. Die proteolytische Aktivität von HTRA1(R166H) konnte hier durch Zugabe eines aktivierenden Peptides teilweise wiederhergestellt werden. Darauf aufbauend wurden verschiedene Möglichkeiten einer HTRA1 Reparatur diskutiert. Eine erfolgreiche Proteinreparatur wäre theoretisch anwendbar auf alle monogenetische Erkrankungen, die durch Assemblierungsdefekte oligomerer Proteine verursacht werden. Die Reparatur von inaktivem, monomerem HTRA1 würde deshalb einen wesentlichen Beitrag zu dem neuen Forschungsbereich der Proteinreparatur leisten.

## 6. Zusammenfassung

Die humane Serinprotease HTRA1 steht mit vielen verschiedenartigen Erkrankungen in Verbindung. Ein Verlust von HTRA1 bzw. der HTRA1 Aktivität wird beispielsweise in diversen Tumorerkrankungen und der Erbkrankheit CARASIL beschrieben. Beobachtete pleiotrope Phänotypen von Zellen mit verringerter *HTRA1* Expression beinhalten ein verstärktes Zellwachstum, Zentrosomen Amplifikationen und Polyploidie. Diese Beobachtungen deuten auf wichtige Funktionen von HTRA1 in regulatorischen Prozessen hin.

Die Expression des *HTRA1* Gens ist in vielen Tumorarten negativ reguliert. Ein *in vivo* Experiment in *K-ras* mutierten aggressiven Tumor-Mausmodellen zeigte jedoch, entgegen des bis dahin postulierten tumorsuppressiven Einflusses von HTRA1, einen protektiven Effekt eines *Htra1 Knockouts* in Abhängigkeit der *K-ras* Mutation. Darüber hinaus wurden die Kinasen B-RAF und C-RAF in einem PDZ-optimierten Peptidscreen als potentielle HTRA1 Liganden identifiziert. Im Rahmen dieser Dissertation wurde deshalb die Interaktion von HTRA1 mit dem ERK-Signalweg in humanen Kolonkarzinomzellen (SW480) analysiert, die stabil verschiedene Level von HTRA1 exprimierten. Dabei konnte eine Interaktion von HTRA1 und C-RAF in den Lysaten von SW480 Zellen, sowie die Bildung eines Komplexes aus rekombinantem HTRA1 und der RAS-Bindedomäne (RBD) von C-RAF *in vitro* nachgewiesen werden. Eine Kolo-kalisation der Proteine in humanen Zellen scheint nach einer Analyse der Zellen mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie möglich. Außerdem wurde die RBD von C-RAF als ein *in vitro* Substrat von HTRA1 identifiziert. Ein Effekt von HTRA1 auf die Aktivität des ERK-Signalweges konnte in Western-Blot Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern nicht beobachtet werden.

Um neue Funktionen und Interaktionspartner von HTRA1 in regulatorischen Prozessen der Zelle zu identifizieren, wurde eine Proteom-Analyse von SW480 Zellen durchgeführt, die in distinkten Zellzyklusphasen synchronisiert waren. Die Ergebnisse der Proteom-Analyse deuten auf Funktionen von HTRA1 in Mikrotubuli-assoziierten Prozessen, dem *G2-DNA damage checkpoint*, der DNA Replikation bzw. des DNA-*Licensing* und der Apoptose hin. Des Weiteren wurde für eine Reihe von Proteinen wie Calpaine, Annexine und MCMs eine bisher unbekannte, Zellzyklus abhängige Regulation beobachtet. Neben anderen potentiellen Interaktoren, wurde das



Calcium-bindende Protein Annexin A1 als bisher unbekanntes HTRA1 Substrat identifiziert. Diese Vermutung konnte in einer Western-Blot Analyse von SW480 Zelllysaten und einem *in vitro* Enzym-Assay bestätigt werden. Da sowohl für HTRA1 als auch für Annexin A1 pro- und anti-apoptotische Funktionen beschrieben wurden, wurde der Effekt von HTRA1 auf die Induktion von Apoptose in SW480 Zellen analysiert. Eine Untersuchung der Zellen mittels Durchflusszytometrie ergab, dass Zellen mit verminderter HTRA1 Menge eine höhere Anzahl sterbender Zellen nach Behandlung mit 5-Fluorurazil aufwiesen, als die anderen Zelllinien. Der induzierte Zelltod war zu einem Teil abhängig von der Aktivität zellulärer Caspasen.

Darüber hinaus wurden vier klinisch relevante HTRA1 Mutanten aus CARASIL auf ihre Aktivität und ihren oligomeren Zustand untersucht. Enzym-Assays zeigten eine verminderte oder fehlende proteolytische Aktivität aller vier Mutanten. Die analytische Größenausschlusschromatographie und *Crosslink*-Experimente zeigten, dass der Verlust der proteolytischen Aktivität auf einen Assemblierungsdefekt der Mutanten zurückzuführen war. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Analyse legen dar, dass auch Mutationen außerhalb der Proteasedomäne über einen Assemblierungsdefekt zu einer Inaktivierung von HTRA1 führen können. Die Aktivität einer Mutante (R166H) konnte durch Zugabe eines Peptid-Liganden beispielhaft um 40 % restauriert werden. In der monogenetischen Erkrankung CARASIL stellt HTRA1 ein logisches Ziel proteinbasierter Therapien dar. Zusätzlich würde die Wiederherstellung der HTRA1 Aktivität durch Methoden der supramolekularen Chemie einen wichtigen Beitrag für das neue Feld der Proteinreparatur leisten.

## 6.1. Abstract

The human serine protease HTRA1 is implicated in several severe pathologies. The loss of HTRA1 or the HTRA1 activity, respectively, is associated with different types of cancer and the hereditary CARASIL disease. Cells with a reduced *HTRA1* expression show pleiotropic phenotypes like an increased proliferation, centrosome amplifications and polyploidy. These features suggest an important function of HTRA1 in regulatory processes of the cell.

The expression of the *HTRA1* gene is downregulated in many types of human tumors. An *in vivo* experiment in *K-ras* mutated aggressive tumor mouse models, however, showed a protective effect of an *Htra1* knockout according to the *K-ras* mutation. These results contrast with the so far postulated tumor-suppressive function of HTRA1. In addition, B-RAF and C-RAF kinases were identified as potential HTRA1 ligands in a PDZ-domain optimized peptide screen with recombinant HTRA1. Therefore, the possible interaction of HTRA1 and the ERK signal transduction pathway was analyzed in human colon carcinoma cells (SW480). These cells stably expressed varying levels of HTRA1. In lysates of SW480 cells an interaction of HTRA1 and C-RAF was observed. Moreover, the formation of a complex of recombinant HTRA1 and the RAS-binding domain (RBD) of C-RAF was identified *in vitro*. A colocalization of both proteins seems possible after analysis in SW480 cells with confocal laser scanning microscopy (CLSM). In addition, the RBD of C-RAF was identified as a novel *in vitro* substrate of HTRA1. An effect of varying HTRA1 levels on the activity of the ERK signal transduction pathway could, however, not be observed by western blotting analysis with phospho-specific antibodies.

To identify new functions and interactors of HTRA1 in cellular processes, a whole proteom analysis of SW480 cells, synchronized in all cell cycle phases, was performed. The results of this analysis suggest possible functions of HTRA1 in microtubule associated processes, the G2-DNA damage checkpoint, DNA replication and DNA licensing, respectively, and in apoptosis. Moreover, for some proteins like calpains, annexins and MCMs a so far unknown cell cycle dependent regulation was described. Besides other potential interactors the calcium binding protein annexin A1 was identified as a potential HTRA1 substrate, which was confirmed via a western blot

analysis and *in vitro* enzyme assay. As pro- and anti-apoptotic functions were reported in previous studies for HTRA1 and annexin A1 both, the effect of HTRA1 on induction of apoptosis was analyzed in SW480 cells. A flowcytometric analysis of SW480 cells with varying HTRA1 levels revealed that cells with reduced HTRA1 levels show higher amounts of dying cells after a 5-fluorouracil treatment than the other cell lines. The cell death induced was at least partially dependent on the activity of cellular caspases.

In addition to the effects of HTRA1 on cellular signaling and apoptosis, the analysis of clinically relevant HTRA1 mutations identified in CARASIL was another focus of this work. Four mutated recombinant variants of HTRA1 were tested for their activity and oligomeric state and compared to the wildtype protein. Enzyme assays showed a reduced or no proteolytic activity for all mutants tested. Analytic size exclusion chromatography and crosslink experiments showed that this loss of activity was due to an assembly defect of the mutated proteins. The results of this *in vitro* study suggest that clinically relevant CARASIL mutations which are located outside of the protease domain of HTRA1 can reduce the protease activity by causing an assembly defect of the HTRA1 trimer. The activity of HTRA1(R166H) was exemplarily restored upon 40 % by the addition of a peptide ligand. As CARASIL is a monogenetic disease HTRA1 displays a logical target for protein based therapies. Moreover, the restauration of the HTRA1 activity by methods of supramolecular chemistry could contribute to the new field of protein repair.

## 7. Referenzen

- Alessi D. R., Saito Y., Campbell D. G., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A., Marshall C. J. and Cowley S. (1994). "Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1." *EMBO J* 13(7): 1610-1619.
- Ando Y., Imamura S., Hong Y. M., Owada M. K., Kakunaga T. and Kannagi R. (1989). "Enhancement of calcium sensitivity of lipocortin I in phospholipid binding induced by limited proteolysis and phosphorylation at the amino terminus as analyzed by phospholipid affinity column chromatography." *J Biol Chem* 264(12): 6948-6955.
- Arur S., Uche U. E., Rezaul K., Fong M., Scranton V., Cowan A. E., Mohler W. and Han D. K. (2003). "Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment." *Dev Cell* 4(4): 587-598.
- Bacus S. S., Gudkov A. V., Lowe M., Lyass L., Yung Y., Komarov A. P., Keyomarsi K., Yarden Y. and Seger R. (2001). "Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53." *Oncogene* 20(2): 147-155.
- Bailis J. M. and Forsburg S. L. (2004). "MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair." *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14(1): 17-21.
- Baldi A., De Luca A., Morini M., Battista T., Felsani A., Baldi F., Catricalà C., Amantea A., Noonan D. M., Albini A., Natali P. G., Lombardi D. and Paggi M. G. (2002). "The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells." *Oncogene* 21: 6684-6688.
- Baldi A., Mottolese M., Vincenzi B., Campioni M., Mellone P., Di Marino M., di Crescenzo V. G., Visca P., Menegozzo S., Spugnini E. P., Citro G., Ceribelli A., Mirri A., Chien J., Shridhar V., Ehrmann M., Santini M. and Facciolo F. (2008). "The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma." *Pharmacogenomics* 9(8): 1069-1077.
- Barnes J. A. and Gomes A. V. (2002). "Proteolytic signals in the primary structure of annexins." *Mol Cell Biochem* 231(1-2): 1-7.
- Barrett A. J., Rawlings N. D. and O'Brien E. A. (2001). "The MEROPS database as a protease information system." *J Struct Biol* 134(2-3): 95-102.
- Beaufort N., Scharrer E., Kremmer E., Lux V., Ehrmann M., Huber R., Houlden H., Werring D., Haffner C. and Dichgans M. (2014). "Cerebral small vessel disease-related protease HtrA1 processes latent TGF-beta binding protein 1 and facilitates TGF-beta signaling." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(46): 16496-16501.
- Bechara C. and Sagan S. (2013). "Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?" *FEBS Lett.* 587(12): 1693-1702.
- Beilina A., Van Der Brug M., Ahmad R., Kesavapany S., Miller D. W., Petsko G. A. and Cookson M. R. (2005). "Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(16): 5703-5708.

- Bivona T. G., Quatela S. E., Bodemann B. O., Ahearn I. M., Soskis M. J., Mor A., Miura J., Wiener H. H., Wright L., Saba S. G., Yim D., Fein A., Perez de Castro I., Li C., Thompson C. B., Cox A. D. and Philips M. R. (2006). "PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis." *Mol Cell* 21(4): 481-493.
- Bleichert F., Botchan M. R. and Berger J. M. (2017). "Mechanisms for initiating cellular DNA replication." *Science* 355(6327).
- Boguski M. S. and McCormick F. (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." *Nature* 366(6456): 643-654.
- Boisguerin P., Ay B., Radziwill G., Fritz R. D., Moelling K. and Volkmer R. (2007). "Characterization of a putative phosphorylation switch: adaptation of SPOT synthesis to analyze PDZ domain regulation mechanisms." *Chembiochem* 8(18): 2302-2307.
- Boisguerin P., Leben R., Ay B., Radziwill G., Moelling K., Dong L. and Volkmer-Engert R. (2004). "An improved method for the synthesis of cellulose membrane-bound peptides with free C termini is useful for PDZ domain binding studies." *Chem. Biol.* 11(4): 449-459.
- Bouali S., Chretien A. S., Ramacci C., Rouyer M., Becuwe P. and Merlin J. L. (2009). "PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells." *Oncol Rep* 21(3): 731-735.
- Boulton T. G., Nye S. H., Robbins D. J., Ip N. Y., Radziejewska E., Morgenbesser S. D., DePinho R. A., Panayotatos N., Cobb M. H. and Yancopoulos G. D. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." *Cell* 65(4): 663-675.
- Bowden M. A., Di Nezza-Cossens L. A., Jobling T., Salamonsen L. A. and Nie G. (2006). "Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer." *Gynecol. Oncol.* 103(1): 253-260.
- Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brummer T., Naegele H., Reth M. and Misawa Y. (2003). "Identification of novel ERK-mediated feedback phosphorylation sites at the C-terminus of B-Raf." *Oncogene* 22(55): 8823-8834.
- Buday L. and Downward J. (2008). "Many faces of Ras activation." *Biochim Biophys Acta* 1786(2): 178-187.
- Burrows A. C., Prokop J. and Summers M. K. (2012). "Skp1-Cul1-F-box ubiquitin ligase (SCF(betaTrCP))-mediated destruction of the ubiquitin-specific protease USP37 during G2-phase promotes mitotic entry." *J Biol Chem* 287(46): 39021-39029.

- Cairns R. A. and Mak T. W. (2017). "Fire and water: Tumor cell adaptation to metabolic conditions." *Exp Cell Res* 356(2): 204-208.
- Campioni M., Severino A., Manente L., Tuduce I. L., Toldo S., Caraglia M., Crispi S., Ehrmann M., He X., Maguire J., De Falco M., De Luca A., Shridhar V. and Baldi A. (2010). "The Serine Protease HtrA1 Specifically Interacts and Degrades the Tuberous Sclerosis Complex 2 Protein." *Mol. Cancer Res.* 8: 1248-1260.
- Castellano E. and Santos E. (2011). "Functional specificity of ras isoforms: so similar but so different." *Genes Cancer* 2(3): 216-231.
- Chang E. H., Gonda M. A., Ellis R. W., Scolnick E. M. and Lowy D. R. (1982). "Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(16): 4848-4852.
- Chien J., Aletti G., Baldi A., Catalano V., Muretto P., Keeney G. L., Kalli K. R., Staub J., Ehrmann M., Cliby W. A., Lee Y. K., Bible K. C., Hartmann L. C., Kaufmann S. H. and Shridhar V. (2006). "Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity." *J. Clin. Invest.* 116(7): 1994-2004.
- Chien J., Campioni M., Shridhar V. and Baldi A. (2009). "HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer." *Curr. Cancer Drug Targets* 9(4): 451-468.
- Chien J., He X. and Shridhar V. (2009). "Identification of tubulins as substrates of serine protease HtrA1 by mixture-based oriented peptide library screening." *J. Cell. Biochem.* 107(2): 253-263.
- Chien J., Ota T., Aletti G., Shridhar R., Boccellino M., Quagliuolo L., Baldi A. and Shridhar V. (2009). "Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration." *Mol. Cell Biol.* 29(15): 4177-4187.
- Chien J., Staub J., Hu S. I., Erickson-Johnson M. R., Couch F. J., Smith D. I., Crowl R. M., Kaufmann S. H. and Shridhar V. (2004). "A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer." *Oncogene* 23(8): 1636-1644.
- Chiu V. K., Bivona T., Hach A., Sajous J. B., Silletti J., Wiener H., Johnson R. L., 2nd, Cox A. D. and Philips M. R. (2002). "Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi." *Nat Cell Biol* 4(5): 343-350.
- Chong H., Vikis H. G. and Guan K. L. (2003). "Mechanisms of regulating the Raf kinase family." *Cell Signal* 15(5): 463-469.
- Clausen T., Kaiser M., Huber R. and Ehrmann M. (2011). "HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12(3): 152-162.
- Clausen T., Southan C. and Ehrmann M. (2002). "The HtrA family of proteases. Implications for protein composition and cell fate." *Mol. Cell* 10: 443-455.
- Clawson G. A., Bui V., Xin P., Wang N. and Pan W. (2008). "Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins." *J. Cell. Biochem.* 105(1): 81-88.

- 
- Cox J., Neuhauser N., Michalski A., Scheltema R. A., Olsen J. V. and Mann M. (2011). "Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment." *J. Proteome Res.* 10(4): 1794-1805.
- Creutz C. E. (1992). "The annexins and exocytosis." *Science* 258(5084): 924-931.
- Crews C. M., Alessandrini A. and Erikson R. L. (1992). "The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product." *Science* 258(5081): 478-480.
- Davey M. J., Indiani C. and O'Donnell M. (2003). "Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture." *J Biol Chem* 278(7): 4491-4499.
- Davies E. J., Marsh Durban V., Meniel V., Williams G. T. and Clarke A. R. (2014). "PTEN loss and KRAS activation leads to the formation of serrated adenomas and metastatic carcinoma in the mouse intestine." *J Pathol* 233(1): 27-38.
- De Luca A., De Falco M., Fedele V., Cobellis L., Mastrogiacomo A., Laforgia V., Tuduce I. L., Campioni M., Giraldi D., Paggi M. G. and Baldi A. (2004). "The serine protease HtrA1 is upregulated in the human placenta during pregnancy." *J. Histochem. Cytochem.* 52(7): 885-892.
- De Luca A., De Falco M., Severino A., Campioni M., Santini D., Baldi F., Paggi M. G. and Baldi A. (2003). "Distribution of the Serine Protease HtrA1 in Normal Human Tissues." *J. Histochem. Cytochem.* 51(10): 1279-1284.
- Derijard B., Hibi M., Wu I. H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M. and Davis R. J. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* 76(6): 1025-1037.
- Dewan A., Liu M., Hartman S., Zhang S., Liu D., Zhao C., Tam P., Chan W., Lam D., Snyder M., Barnstable C., Pang C. and Hoh J. (2006). "HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration." *Science* 314: 989-992.
- Donnelly S. R. and Moss S. E. (1997). "Annexins in the secretory pathway." *Cell Mol Life Sci* 53(6): 533-538.
- Dougherty M. K., Muller J., Ritt D. A., Zhou M., Zhou X. Z., Copeland T. D., Conrads T. P., Veenstra T. D., Lu K. P. and Morrison D. K. (2005). "Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation." *Mol Cell* 17(2): 215-224.
- Downward J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 3(1): 11-22.
- Doyle D. A., Lee A., Lewis J., Kim E., Sheng M. and MacKinnon R. (1996). "Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ." *Cell* 85(7): 1067-1076.
- Draetta G. and Beach D. (1988). "Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement." *Cell* 54(1): 17-26.

- 
- Eden E., Navon R., Steinfeld I., Lipson D. and Yakhini Z. (2009). "GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists." *BMC Bioinformatics* 10: 48.
- Eigenbrot C., Ultsch M., Lipari M. T., Moran P., Lin S. J., Ganesan R., Quan C., Tom J., Sandoval W., van Lookeren Campagne M. and Kirchhofer D. (2012). "Structural and functional analysis of HtrA1 and its subdomains." *Structure* 20(6): 1040-1050.
- Emans N., Gorvel J. P., Walter C., Gerke V., Kellner R., Griffiths G. and Gruenberg J. (1993). "Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles." *J Cell Biol* 120(6): 1357-1369.
- Esposito V., Campioni M., De Luca A., Spugnini E. P., Baldi F., Cassandro R., Mancini A., Vincenzi B., Groeger A., Caputi M. and Baldi A. (2006). "Analysis of HtrA1 serine protease expression in human lung cancer." *Anticancer Res.* 26(5A): 3455-3459.
- Fadeel B. and Orrenius S. (2005). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease." *J Intern Med* 258(6): 479-517.
- Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di Ilio C. and De Laurenzi V. (2012). "Role of apoptosis in disease." *Aging (Albany NY)* 4(5): 330-349.
- Feng L., Huang J. and Chen J. (2009). "MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair." *Genes Dev.* 23(6): 719-728.
- Fischer U., Janicke R. U. and Schulze-Osthoff K. (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." *Cell Death Differ* 10(1): 76-100.
- Fischer U. and Schulze-Osthoff K. (2005). "New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease." *Pharmacol Rev* 57(2): 187-215.
- Forbes S. A., Bindal N., Bamford S., Cole C., Kok C. Y., Beare D., Jia M., Shepherd R., Leung K., Menzies A., Teague J. W., Campbell P. J., Stratton M. R. and Futreal P. A. (2011). "COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer." *Nucleic Acids Res* 39(Database issue): D945-950.
- Forman M. S., Trojanowski J. Q. and Lee V. M. (2004). "Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs." *Nat. Med.* 10(10): 1055-1063.
- Freshney N. W., Rawlinson L., Guesdon F., Jones E., Cowley S., Hsuan J. and Saklatvala J. (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." *Cell* 78(6): 1039-1049.
- Fuentes-Prior P. and Salvesen G. S. (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." *Biochem J* 384(Pt 2): 201-232.
- Fukutake T. (2011). "Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL): from discovery to gene identification." *J Stroke Cerebrovasc Dis* 20(2): 85-93.



- Furth M. E., Aldrich T. H. and Cordon-Cardo C. (1987). "Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues." *Oncogene* 1(1): 47-58.
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., Dawson T. M., Dawson V. L., El-Deiry W. S., Fulda S., Gottlieb E., Green D. R., Hengartner M. O., Kepp O., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nunez G., Peter M. E., Piacentini M., Rubinsztein D. C., Shi Y., Simon H. U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G. and Kroemer G. (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* 19(1): 107-120.
- Gerke V., Creutz C. E. and Moss S. E. (2005). "Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 449-461.
- Gerke V. and Moss S. E. (1997). "Annexins and membrane dynamics." *Biochim Biophys Acta* 1357(2): 129-154.
- Gomez N. and Cohen P. (1991). "Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases." *Nature* 353(6340): 170-173.
- Gonen H., Shkedy D., Barnoy S., Kosower N. S. and Ciechanover A. (1997). "On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53." *FEBS Lett* 406(1-2): 17-22.
- Grau S., Baldi A., Bussani R., Tian X., Stefanescu R., Przybylski M., Richards P., Jones S. A., Shridhar V., Clausen T. and Ehrmann M. (2005). "Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(17): 6021-6026.
- Grau S., Richards P. J., Kerr B., Hughes C., Caterson B., Williams A. S., Junker U., Jones S. A., Clausen T. and Ehrmann M. (2006). "The role of human HtrA1 in arthritic disease." *J. Biol. Chem.* 281(10): 6124-6129.
- Gray C. W., Ward R. V., Karran E., Turconi S., Rowles A., Viglienghi D., Southan C., Barton A., Fantom K. G., West A., Savopoulos J., Hassan N. J., Clinkenbeard H., Hanning C., Amegadzie B., Davis J. B., Dingwall C., Livi G. P. and Creasy C. L. (2000). "Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response." *Eur. J. Biochem.* 267(18): 5699-5710.
- Guroff G. (1964). "A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain." *J Biol Chem* 239: 149-155.
- Haffner C., Malik R. and Dichgans M. (2016). "Genetic factors in cerebral small vessel disease and their impact on stroke and dementia." *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 36(1): 158-171.
- Hall B. E., Bar-Sagi D. and Nassar N. (2002). "The structural basis for the transition from Ras-GTP to Ras-GDP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12138-12142.

- Hanahan D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hara K., Shiga A., Fukutake T., Nozaki H., Miyashita A., Yokoseki A., Kawata H., Koyama A., Arima K., Takahashi T., Ikeda M., Shiota H., Tamura M., Shimoe Y., Hirayama M., Arisato T., Yanagawa S., Tanaka A., Nakano I., Ikeda S., Yoshida Y., Yamamoto T., Ikeuchi T., Kuwano R., Nishizawa M., Tsuji S. and Onodera O. (2009). "Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease." *N. Engl. J. Med.* 360(17): 1729-1739.
- Harder T. and Gerke V. (1993). "The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin IIp11(2) complex." *J Cell Biol* 123(5): 1119-1132.
- Harding A., Hsu V., Kornfeld K. and Hancock J. F. (2003). "Identification of residues and domains of Raf important for function in vivo and in vitro." *J Biol Chem* 278(46): 45519-45527.
- Harris B. Z. and Lim W. A. (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." *J Cell Sci* 114(Pt 18): 3219-3231.
- Hartwell L. H. and Weinert T. A. (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* 246(4930): 629-634.
- Hasenbein S., Meltzer M., Hauske P., Kaiser M., Huber R., Clausen T. and Ehrmann M. (2010). "Conversion of a regulatory into a degradative protease." *J. Mol. Biol.* 397(4): 957-966.
- Hasselblatt H., Kurzbauer R., Wilken C., Krojer T., Sawa J., Kurt J., Kirk R., Hasenbein S., Ehrmann M. and Clausen T. (2007). "Regulation of the sE stress response by DegS: How the PDZ domain keeps the protease inactive in the resting state and allows integration of different OMP-derived stress signals upon folding stress." *Genes Dev.* 21: 2659-2670.
- He X., Khurana A., Maguire J. L., Chien J. and Shridhar V. (2012). "HtrA1 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced cytotoxicity by targeting XIAP for degradation." *Int. J. Cancer* 130(5): 1029-1035.
- Hebert D. N. and Molinari M. (2007). "In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases." *Physiol Rev* 87(4): 1377-1408.
- Hengartner M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-776.
- Hershko A. and Ciechanover A. (1986). "The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 33: 19-56, 301.
- Hershko A. and Ciechanover A. (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Hochegger H., Takeda S. and Hunt T. (2008). "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(11): 910-916.

- Hou J., Clemmons D. R. and Smeekens S. (2005). "Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5." *J Cell Biochem* 94(3): 470-484.
- Hu S. I., Carozza M., Klein M., Nantermet P., Luk D. and Crowl R. M. (1998). "Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage." *J. Biol. Chem.* 273(51): 34406-34412.
- Huang L., Liao L., Wan Y., Cheng A., Li M., Chen S., Li M., Tan X. and Zeng G. (2016). "Downregulation of Annexin A1 is correlated with radioresistance in nasopharyngeal carcinoma." *Oncol Lett* 12(6): 5229-5234.
- Huttunen H. J., Guenette S. Y., Peach C., Greco C., Xia W., Kim D. Y., Barren C., Tanzi R. E. and Kovacs D. M. (2007). "HtrA2 regulates beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism through endoplasmic reticulum-associated degradation." *J. Biol. Chem.* 282(38): 28285-28295.
- Hydbring P., Malumbres M. and Sicinski P. (2016). "Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17(5): 280-292.
- Ichimura Y., Kirisako T., Takao T., Satomi Y., Shimonishi Y., Ishihara N., Mizushima N., Tanida I., Kominami E., Ohsumi M., Noda T. and Ohsumi Y. (2000). "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation." *Nature* 408(6811): 488-492.
- Inagaki A., Nishizawa H., Ota S., Suzuki M., Inuzuka H., Miyamura H., Sekiya T., Kurahashi H. and Udagawa Y. (2012). "Upregulation of HtrA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia." *Placenta* 33(11): 919-926.
- Ishimi Y. (1997). "A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex." *J Biol Chem* 272(39): 24508-24513.
- Johnson G. L. and Dhanasekaran N. (1989). "The G-protein family and their interaction with receptors." *Endocr Rev* 10(3): 317-331.
- Julien O. and Wells J. A. (2017). "Caspases and their substrates." *Cell Death Differ* 24(8): 1380-1389.
- Kastan M. B. and Bartek J. (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." *Nature* 432(7015): 316-323.
- Kato M. V., Sato H., Tsukada T., Ikawa Y., Aizawa S. and Nagayoshi M. (1996). "A follistatin-like gene, mac25, may act as a growth suppressor of osteosarcoma cells." *Oncogene* 12(6): 1361-1364.
- Kenis H., van Genderen H., Bennaghmouch A., Rinia H. A., Frederik P., Narula J., Hofstra L. and Reutelingsperger C. P. (2004). "Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry." *J Biol Chem* 279(50): 52623-52629.

- 
- Kim H. J. and Bar-Sagi D. (2004). "Modulation of signalling by Sprouty: a developing story." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(6): 441-450.
- King R. W., Deshaies R. J., Peters J. M. and Kirschner M. W. (1996). "How proteolysis drives the cell cycle." *Science* 274(5293): 1652-1659.
- Kiriyama Y. and Nochi H. (2015). "The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases." *Int J Mol Sci* 16(11): 26797-26812.
- Kobayashi M., Oshima S., Maeyashiki C., Nibe Y., Otsubo K., Matsuzawa Y., Nemoto Y., Nagaishi T., Okamoto R., Tsuchiya K., Nakamura T. and Watanabe M. (2016). "The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development." *Sci Rep* 6: 36780.
- Kolmar H., Waller P. R. and Sauer R. T. (1996). "The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of Escherichia coli: specificity for cleavage sites and substrate conformation." *J. Bacteriol.* 178(20): 5925-5929.
- Krick S., Shi S., Ju W., Faul C., Tsai S. Y., Mundel P. and Bottinger E. P. (2008). "Mpv17l protects against mitochondrial oxidative stress and apoptosis by activation of Omi/HtrA2 protease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37): 14106-14111.
- Kroemer G., Galluzzi L. and Brenner C. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* 87(1): 99-163.
- Krojer T., Garrido-Franco M., Huber R., Ehrmann M. and Clausen T. (2002). "Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine." *Nature* 416(6879): 455-459.
- Krojer T., Sawa J., Schafer E., Saibil H. R., Ehrmann M. and Clausen T. (2008). "Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP." *Nature* 453(7197): 885-890.
- Kubbutat M. H. and Vousden K. H. (1997). "Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability." *Mol Cell Biol* 17(1): 460-468.
- Kyriakis J. M., Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Rubie E. A., Ahmad M. F., Avruch J. and Woodgett J. R. (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." *Nature* 369(6476): 156-160.
- Launay S., Maubert E., Lebeurrier N., Tennstaedt A., Campioni M., Docagne F., Gabriel C., Dauphinot L., Potier M. C., Ehrmann M., Baldi A. and Vivien D. (2008). "HtrA1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival." *Cell Death Differ.* 15(9): 1408-1416.
- Lee J. D., Ulevitch R. J. and Han J. (1995). "Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase." *Biochem Biophys Res Commun* 213(2): 715-724.
- Leibovitz A., Stinson J. C., McCombs W. B., 3rd, McCoy C. E., Mazur K. C. and Mabry N. D. (1976). "Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines." *Cancer Res* 36(12): 4562-4569.

- Leon J., Guerrero I. and Pellicer A. (1987). "Differential expression of the ras gene family in mice." *Mol Cell Biol* 7(4): 1535-1540.
- Linardou H., Briasoulis E., Dahabreh I. J., Mountzios G., Papadimitriou C., Papadopoulos S., Bafaloukos D., Kosmidis P. and Murray S. (2011). "All about KRAS for clinical oncology practice: gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer." *Cancer Treat Rev* 37(3): 221-233.
- Lipinska B., Sharma S. and Georgopoulos C. (1988). "Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription." *Nucleic Acids Res.* 16: 10053-10067.
- Liu J., Dong F. and Hoh J. (2015). "Loss of HtrA1-induced attenuation of TGF-beta signaling in fibroblasts might not be the main mechanism of CARASIL pathogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(14): E1693.
- Los M., Wesselborg S. and Schulze-Osthoff K. (1999). "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice." *Immunity* 10(6): 629-639.
- Luck K., Charbonnier S. and Trave G. (2012). "The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains." *FEBS Lett.* 586(17): 2648-2661.
- Maeda S., Nakayama H., Isaka K., Aihara Y. and Nemoto S. (1976). "Familial unusual encephalopathy of Binswanger's type without hypertension." *Folia Psychiatr Neurol Jpn* 30(2): 165-177.
- Maehama T. and Dixon J. E. (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *J Biol Chem* 273(22): 13375-13378.
- Malet H., Canellas F., Sawa J., Yan J., Thalassinou K., Ehrmann M., Clausen T. and Saibil H. R. (2012). "Binding of substrate proteins inside the molecular cage of the chaperone-protease DegQ." *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19: 152-157.
- Marais R., Light Y., Paterson H. F. and Marshall C. J. (1995). "Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation." *EMBO J* 14(13): 3136-3145.
- Marais R., Light Y., Paterson H. F., Mason C. S. and Marshall C. J. (1997). "Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases." *J Biol Chem* 272(7): 4378-4383.
- Marchler-Bauer A., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., He S., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Liebert C. A., Liu C., Lu F., Lu S., Marchler G. H., Mullokandov M., Song J. S., Tasneem A., Thanki N., Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N. and Bryant S. H. (2009). "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database." *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D205-210.

- Margarit S. M., Sondermann H., Hall B. E., Nagar B., Hoelz A., Pirruccello M., Barsagi D. and Kuriyan J. (2003). "Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS." *Cell* 112(5): 685-695.
- Martins L. M., Iaccarino I., Tenev T., Gschmeissner S., Totty N. F., Lemoine N. R., Savopoulos J., Gray C. W., Creasy C. L., Dingwall C. and Downward J. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif." *J. Biol. Chem.* 277(1): 439-444.
- Martins L. M., Morrison A., Klupsch K., Fedele V., Moiso N., Teismann P., Abuin A., Grau E., Geppert M., Livi G. P., Creasy C. L., Martin A., Hargreaves I., Heales S. J., Okada H., Brandner S., Schulz J. B., Mak T. and Downward J. (2004). "Neuroprotective Role of the Reaper-Related Serine Protease HtrA2/Omi Revealed by Targeted Deletion in Mice." *Mol. Cell. Biol.* 24(22): 9848-9862.
- Matallanas D., Birtwistle M., Romano D., Zebisch A., Rauch J., von Kriegsheim A. and Kolch W. (2011). "Raf family kinases: old dogs have learned new tricks." *Genes Cancer* 2(3): 232-260.
- McGrath J. P., Capon D. J., Smith D. H., Chen E. Y., Seeburg P. H., Goeddel D. V. and Levinson A. D. (1983). "Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene." *Nature* 304(5926): 501-506.
- Medema R. H. and Macurek L. (2011). "Checkpoint recovery in cells: how a molecular understanding can help in the fight against cancer." *F1000 Biol. Rep.* 3: 10.
- Mehlen P. and Bredesen D. E. (2011). "Dependence receptors: from basic research to drug development." *Sci Signal* 4(157): mr2.
- Meltzer M., Hasenbein S., Hauske P., Kucz N., Merdanovic M., Grau S., Beil A., Jones D., Krojer T., Clausen T., Ehrmann M. and Kaiser M. (2008). "Allosteric activation of HtrA protease DegP by stress signals during bacterial protein quality control." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47(7): 1332-1334.
- Menezes Cordeiro I., Nzwalo H., Sa F., Ferreira R. B., Alonso I., Afonso L. and Basilio C. (2015). "Shifting the CARASIL paradigm: report of a non-Asian family and literature review." *Stroke* 46(4): 1110-1112.
- Miller J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Moiso N., Klupsch K., Fedele V., East P., Sharma S., Renton A., Plun-Favreau H., Edwards R. E., Teismann P., Esposti M. D., Morrison A. D., Wood N. W., Downward J. and Martins L. M. (2009). "Mitochondrial dysfunction triggered by loss of HtrA2 results in the activation of a brain-specific transcriptional stress response." *Cell Death Differ.* 16(3): 449-464.
- Morimoto R. I. (2008). "Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging." *Genes Dev.* 22(11): 1427-1438.

- Morrison D. K. and Davis R. J. (2003). "Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals." *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 91-118.
- Moser A. R., Pitot H. C. and Dove W. F. (1990). "A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse." *Science* 247(4940): 322-324.
- Mowers E. E., Sharifi M. N. and Macleod K. F. (2017). "Autophagy in cancer metastasis." *Oncogene* 36(12): 1619-1630.
- Mullany S. A., Moslemi-Kebria M., Rattan R., Khurana A., Clayton A., Ota T., Mariani A., Podratz K. C., Chien J. and Shridhar V. (2011). "Expression and functional significance of HtrA1 loss in endometrial cancer." *Clin Cancer Res* 17(3): 427-436.
- Munz C. (2016). "Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules." *Immunol Rev* 272(1): 17-27.
- Naor Z., Benard O. and Seger R. (2000). "Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor." *Trends Endocrinol Metab* 11(3): 91-99.
- Nelson P. J. and Daniel T. O. (2002). "Emerging targets: molecular mechanisms of cell contact-mediated growth control." *Kidney Int* 61(1 Suppl): S99-105.
- Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M. C., Grignani F. and Riccardi C. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* 139(2): 271-279.
- Nie G.-Y., Hampton A., Li Y., Findlay J. and Salamonsen L. (2003). "Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2." *Biochem. J.* 371: 39-48.
- Nie G. Y., Hampton A., Li Y., Findlay J. K. and Salamonsen L. A. (2003). "Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2." *Biochem J* 371(Pt 1): 39-48.
- Oceguera-Yanez F., Kimura K., Yasuda S., Higashida C., Kitamura T., Hiraoka Y., Haraguchi T. and Narumiya S. (2005). "Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis." *J. Cell Biol.* 168(2): 221-232.
- Oling F., Santos J. S., Govorukhina N., Mazeres-Dubut C., Bergsma-Schutter W., Oostergetel G., Keegstra W., Lambert O., Lewit-Bentley A. and Brisson A. (2000). "Structure of membrane-bound annexin A5 trimers: a hybrid cryo-EM - X-ray crystallography study." *J Mol Biol* 304(4): 561-573.
- Page M. J. and Di Cera E. (2008). "Evolution of peptidase diversity." *J. Biol. Chem.* 283(44): 30010-30014.
- Park H. J., Kim S. S., Seong Y. M., Kim K. H., Goo H. G., Yoon E. J., Min do S., Kang S. and Rhim H. (2006). "Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target

- of HtrA2 serine protease. Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria." *J. Biol. Chem.* 281(45): 34277-34287.
- Pfaffl M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45.
- Plun-Favreau H., Klupsch K., Moiso N., Gandhi S., Kjaer S., Frith D., Harvey K., Deas E., Harvey R. J., McDonald N., Wood N. W., Martins L. M. and Downward J. (2007). "The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1." *Nat. Cell Biol.* 9(11): 1243-1252.
- Poepsel S., Sprengel A., Sacca B., Kaschani F., Kaiser M., Gatsogiannis C., Raunser S., Clausen T. and Ehrmann M. (2015). "Determinants of amyloid fibril degradation by the PDZ protease HTRA1." *Nat. Chem. Biol.* 11(11): 862-869.
- Prokhorova T. A. and Blow J. J. (2000). "Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity." *J Biol Chem* 275(4): 2491-2498.
- Raemaekers T., Ribbeck K., Beaudouin J., Annaert W., Van Camp M., Stockmans I., Smets N., Bouillon R., Ellenberg J. and Carmeliet G. (2003). "NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization." *J. Cell Biol.* 162(6): 1017-1029.
- Raman M., Chen W. and Cobb M. H. (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." *Oncogene* 26(22): 3100-3112.
- Rescher U. and Gerke V. (2004). "Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2631-2639.
- Riely G. J., Kris M. G., Rosenbaum D., Marks J., Li A., Chitale D. A., Nafa K., Riedel E. R., Hsu M., Pao W., Miller V. A. and Ladanyi M. (2008). "Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma." *Clin Cancer Res* 14(18): 5731-5734.
- Roskoski R., Jr. (2010). "RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation." *Biochem Biophys Res Commun* 399(3): 313-317.
- Rotan O., Severin K., Pöpsel S., Peetsch A., Merdanovic M., Ehrmann M. and Eppe M. (2017). "Uptake of the proteins HTRA1 and HTRA2 by cells mediated by calcium phosphate nanoparticles." *Beilstein J. Nanotechnol.* 8: 381-393.
- Rouse J., Cohen P., Trigon S., Morange M., Alonso-Llamazares A., Zamanillo D., Hunt T. and Nebreda A. R. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* 78(6): 1027-1037.
- Runyon S. T., Zhang Y., Appleton B. A., Sazinsky S. L., Wu P., Pan B., Wiesmann C., Skelton N. J. and Sidhu S. S. (2007). "Structural and functional analysis of the PDZ domains of human HtrA1 and HtrA3." *Protein Sci.* 16(11): 2454-2471.



- Salvesen G. S. and Dixit V. M. (1997). "Caspases: intracellular signaling by proteolysis." *Cell* 91(4): 443-446.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P. and Cardona A. (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nat. Methods* 9(7): 676-682.
- Schmidt N., Irle I., Ripkens K., Lux V., Nelles J., Johannes C., Parry L., Greenow K., Amir S., Campioni M., Baldi A., Oka C., Kawaichi M., Clarke A. R. and Ehrmann M. (2016). "Epigenetic silencing of serine protease HTRA1 drives polyploidy." *BMC Cancer* 16: 399.
- Schubert U., Anton L. C., Gibbs J., Norbury C. C., Yewdell J. W. and Bennink J. R. (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." *Nature* 404(6779): 770-774.
- Schwacha A. and Bell S. P. (2001). "Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication." *Mol Cell* 8(5): 1093-1104.
- Schwank G., Koo B. K., Sasselli V., Dekkers J. F., Heo I., Demircan T., Sasaki N., Boymans S., Cuppen E., van der Ent C. K., Nieuwenhuis E. E., Beekman J. M. and Clevers H. (2013). "Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients." *Cell Stem Cell* 13(6): 653-658.
- Scolnick E., Rands E., Aaronson S. A. and Todaro G. J. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase activity in five RNA viruses: divalent cation requirements." *Proc Natl Acad Sci U S A* 67(4): 1789-1796.
- Seger R., Ahn N. G., Posada J., Munar E. S., Jensen A. M., Cooper J. A., Cobb M. H. and Krebs E. G. (1992). "Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells." *J Biol Chem* 267(20): 14373-14381.
- Sheng M. and Sala C. (2001). "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes." *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1-29.
- Shete H. K., Prabhu R. H. and Patravale V. B. (2014). "Endosomal escape: a bottleneck in intracellular delivery." *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14(1): 460-474.
- Shridhar V., Sen A., Chien J., Staub J., Avula R., Kovats S., Lee J., Lillie J. and Smith D. I. (2002). "Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization." *Cancer Res.* 62(1): 262-270.
- Silva M. T. (2010). "Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program." *FEBS Lett* 584(22): 4491-4499.

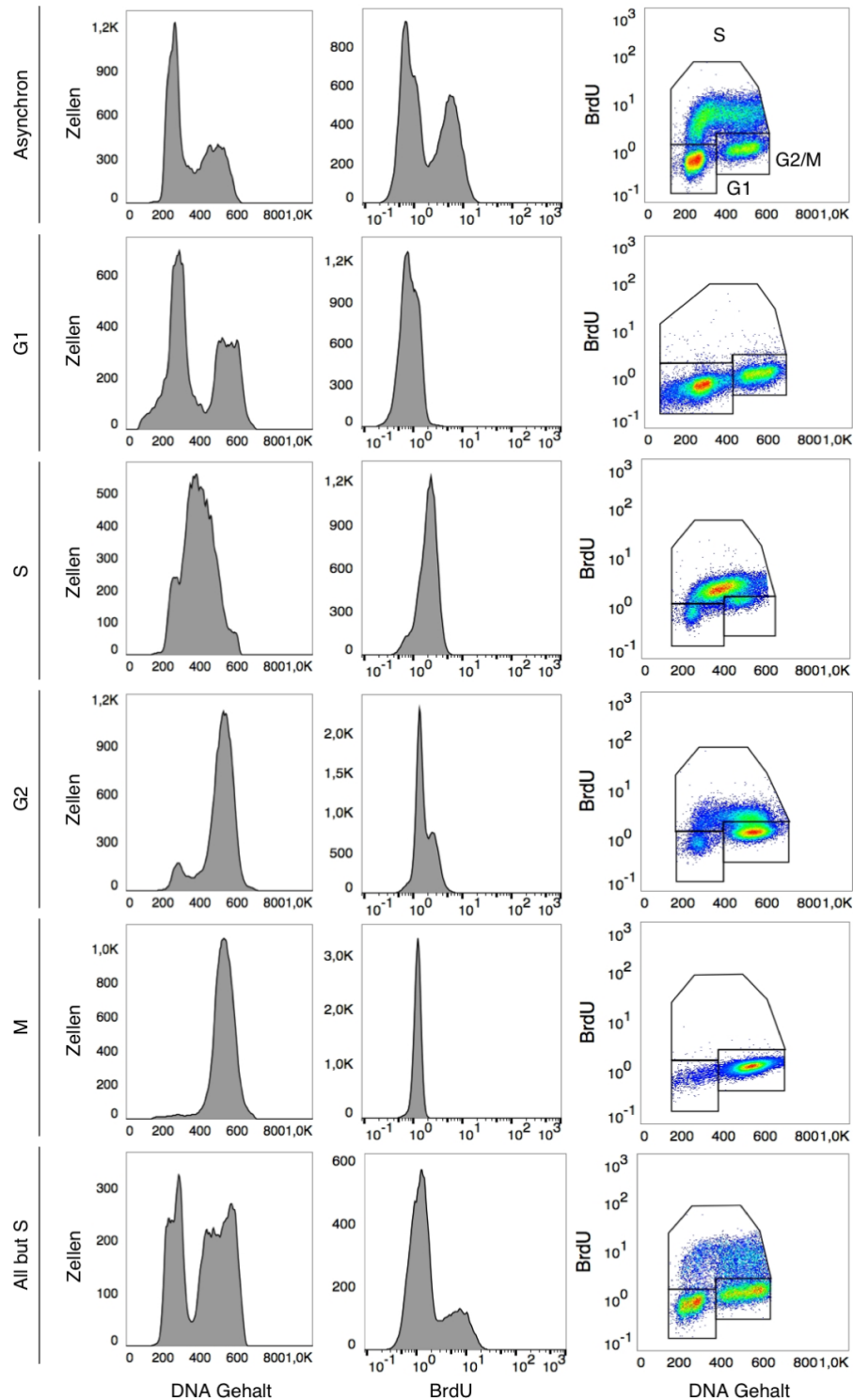
- Simon P. (2003). "Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data." *Bioinformatics* 19(11): 1439-1440.
- Singh H., Zhao M., Chen Q., Wang Y., Li Y., Kaitu'u-Lino T. J., Tong S. and Nie G. (2015). "Human HtrA4 Expression Is Restricted to the Placenta, Is Significantly Up-Regulated in Early-Onset Preeclampsia, and High Levels of HtrA4 Cause Endothelial Dysfunction." *J Clin Endocrinol Metab* 100(7): E936-945.
- Singh S. A., Winter D., Kirchner M., Chauhan R., Ahmed S., Ozlu N., Tzur A., Steen J. A. and Steen H. (2014). "Co-regulation proteomics reveals substrates and mechanisms of APC/C-dependent degradation." *EMBO J.* 33(4): 385-399.
- Solito E., de Coupade C., Canaider S., Goulding N. J. and Perretti M. (2001). "Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation." *Br J Pharmacol* 133(2): 217-228.
- Solito E., Kamal A., Russo-Marie F., Buckingham J. C., Marullo S. and Perretti M. (2003). "A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils." *FASEB J.* 17(11): 1544-1546.
- Songyang Z., Fanning A. S., Fu C., Xu J., Marfatia S. M., Chishti A. H., Crompton A., Chan A. C., Anderson J. M. and Cantley L. C. (1997). "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains." *Science* 275(5296): 73-77.
- Spiess C., Beil A. and Ehrmann M. (1999). "A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein." *Cell* 97(3): 339-347.
- Spiliotis E. T., Kinoshita M. and Nelson W. J. (2005). "A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation." *Science* 307(5716): 1781-1785.
- Strauch K. L. and Beckwith J. (1988). "An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(5): 1576-1580.
- Storr S. J., Safuan S., Woolston C. M., Abdel-Fatah T., Deen S., Chan S. Y. and Martin S. G. (2012). "Calpain-2 expression is associated with response to platinum based chemotherapy, progression-free and overall survival in ovarian cancer." *J Cell Mol Med* 16(10): 2422-2428.
- Strauss K., Martins L., Plun-Favreau H., Marx F., Kautzmann S., Berg D., Gasser T., Wszolek Z., Muller T., Bornemann A., Wolburg H., Downward J., Riess O., Schulz J. and Kruger R. (2005). "Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease." *Hum. Molec. Genet.* 14: 2099-2111.
- Studier F. W. and Moffatt B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* 189(1): 113-130.

- Supanji, Shimomachi M., Hasan M. Z., Kawaichi M. and Oka C. (2013). "HtrA1 is induced by oxidative stress and enhances cell senescence through p38 MAPK pathway." *Exp. Eye Res.* 112: 79-92.
- Talanian R. V., Quinlan C., Trautz S., Hackett M. C., Mankovich J. A., Banach D., Ghayur T., Brady K. D. and Wong W. W. (1997). "Substrate specificities of caspase family proteases." *J. Biol. Chem.* 272(15): 9677-9682.
- Tang Z., Dai S., He Y., Doty R. A., Shultz L. D., Sampson S. B. and Dai C. (2015). "MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1." *Cell* 160(4): 729-744.
- Taylor R. C., Cullen S. P. and Martin S. J. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 231-241.
- Tennstaedt A., Popsel S., Truebestein L., Hauske P., Brockmann A., Schmidt N., Irle I., Sacca B., Niemeyer C. M., Brandt R., Ksiezak-Reding H., Tirniceriu A. L., Egensperger R., Baldi A., Dehmelt L., Kaiser M., Huber R., Clausen T. and Ehrmann M. (2012). "Human High Temperature Requirement Serine Protease A1 (HTRA1) Degrades Tau Protein Aggregates." *J. Biol. Chem.* 287(25): 20931-20941.
- Teyra J., Sidhu S. S. and Kim P. M. (2012). "Elucidation of the binding preferences of peptide recognition modules: SH3 and PDZ domains." *FEBS Lett.* 586(17): 2631-2637.
- Tocharus J., Tsuchiya A., Kajikawa M., Ueta Y., Oka C. and Kawaichi M. (2004). "Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling." *Dev. Growth Differ.* 46(3): 257-274.
- Truebestein L., Tennstaedt A., Monig T., Krojer T., Canellas F., Kaiser M., Clausen T. and Ehrmann M. (2011). "Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity." *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18(3): 386-388.
- Tsuchiya A., Yano M., Tocharus J., Kojima H., Fukumoto M., Kawaichi M. and Oka C. (2005). "Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis." *Bone* 37(3): 323-336.
- Tyanova S., Temu T., Sinitcyn P., Carlson A., Hein M. Y., Geiger T., Mann M. and Cox J. (2016). "The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data." *Nat. Methods* 13(9): 731-740.
- Vande Walle L., Lamkanfi M. and Vandenabeele P. (2008). "The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview." *Cell Death Differ.* 15(3): 453-460.
- Vassilev L. T. (2006). "Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1." *Cell Cycle* 5(22): 2555-2556.
- Verhagen A. M., Silke J., Ekert P. G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L. M., Day C. L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R. L., Simpson R. J. and Vaux D. L.

- (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." *J. Biol. Chem.* 277(1): 445-454.
- Vigil D., Cherfils J., Rossman K. L. and Der C. J. (2010). "Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?" *Nat Rev Cancer* 10(12): 842-857.
- Vivanco I., Palaskas N., Tran C., Finn S. P., Getz G., Kennedy N. J., Jiao J., Rose J., Xie W., Loda M., Golub T., Mellinghoff I. K., Davis R. J., Wu H. and Sawyers C. L. (2007). "Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN." *Cancer Cell* 11(6): 555-569.
- Wajant H. (2002). "The Fas signaling pathway: more than a paradigm." *Science* 296(5573): 1635-1636.
- Wang C., Xiao Q., Li Y. W., Zhao C., Jia N., Li R. L., Cao S. S., Cui J., Wang L., Wu Y. and Wen A. D. (2014). "Regulatory mechanisms of annexin-induced chemotherapy resistance in cisplatin resistant lung adenocarcinoma." *Asian Pac J Cancer Prev* 15(7): 3191-3194.
- Wang H., Yu J., Zhang L., Xiong Y., Chen S., Xing H., Tian Z., Tang K., Wei H., Rao Q., Wang M. and Wang J. (2014). "RPS27a promotes proliferation, regulates cell cycle progression and inhibits apoptosis of leukemia cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446(4): 1204-1210.
- Wang J. and Maldonado M. A. (2006). "The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases." *Cell Mol Immunol* 3(4): 255-261.
- Wang L. J., Cheong M. L., Lee Y. S., Lee M. T. and Chen H. (2012). "High-temperature requirement protein A4 (HtrA4) suppresses the fusogenic activity of syncytin-1 and promotes trophoblast invasion." *Mol Cell Biol* 32(18): 3707-3717.
- Weber C. K., Slupsky J. R., Herrmann C., Schuler M., Rapp U. R. and Block C. (2000). "Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes." *Oncogene* 19(2): 169-176.
- Wellbrock C., Karasarides M. and Marais R. (2004). "The RAF proteins take centre stage." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 875-885.
- Willumsen B. M., Christensen A., Hubbert N. L., Papageorge A. G. and Lowy D. R. (1984). "The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association." *Nature* 310(5978): 583-586.
- Winklhofer K. F. and Haass C. (2010). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." *Biochim. Biophys. Acta* 1802(1): 29-44.
- Woo M. G., Xue K., Liu J., McBride H. and Tsang B. K. (2012). "Calpain-mediated processing of p53-associated parkin-like cytoplasmic protein (PARC) affects chemosensitivity of human ovarian cancer cells by promoting p53 subcellular trafficking." *J Biol Chem* 287(6): 3963-3975.

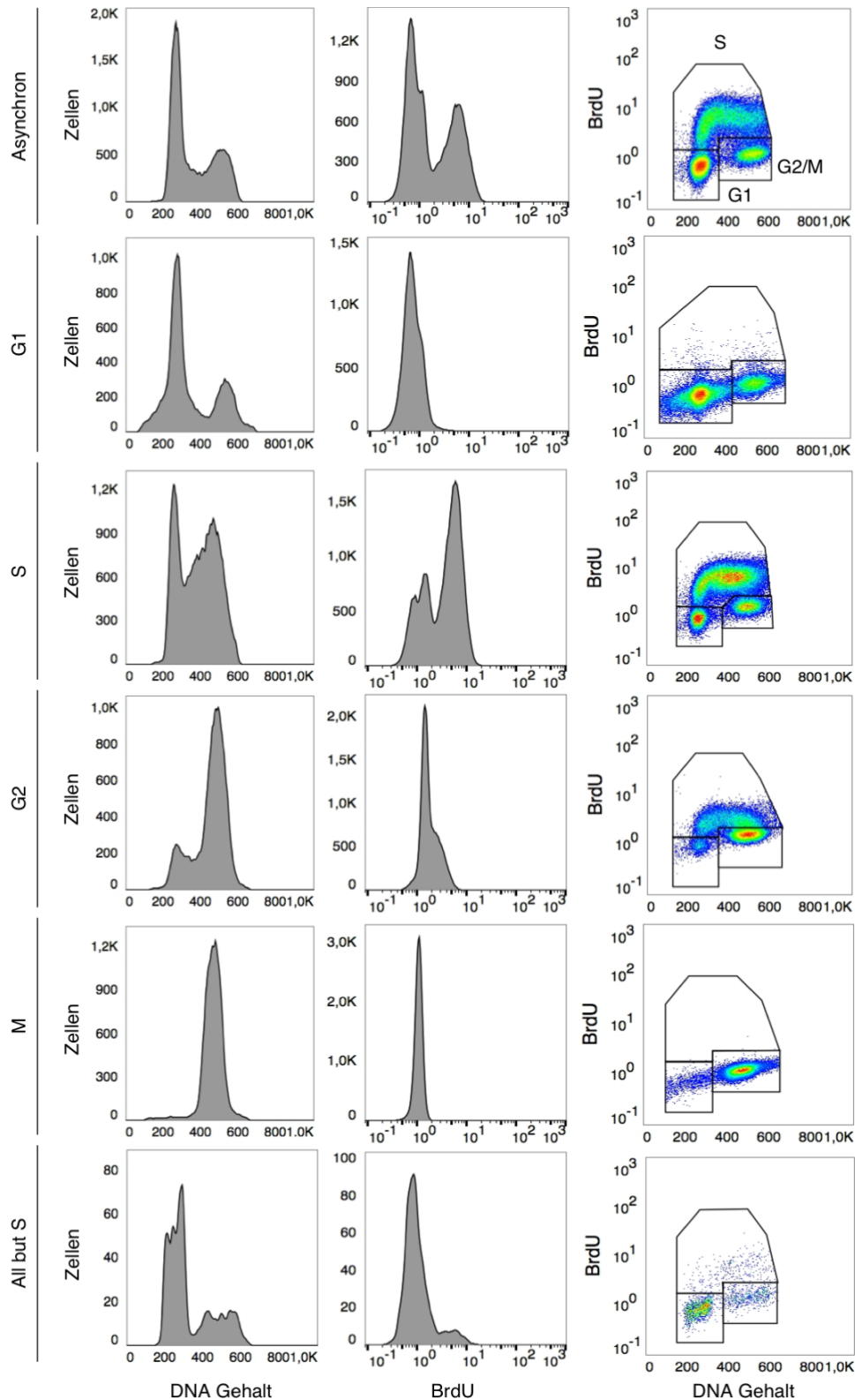
- 
- Yan K., Li L., Wang X., Hong R., Zhang Y., Yang H., Lin M., Zhang S., He Q., Zheng D., Tang J., Yin Y. and Shao G. (2015). "The deubiquitinating enzyme complex BRISC is required for proper mitotic spindle assembly in mammalian cells." *J. Cell Biol.* 210(2): 209-224.
- Yanagawa S., Ito N., Arima K. and Ikeda S. (2002). "Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." *Neurology* 58(5): 817-820.
- Yang Z., Camp N., Sun H., Tong Z., Gibbs D., Cameron D., Chen H., Zhao Y., Pearson E., Li X., Chien J., Dewan A., Harmon J., Bernstein P., Shridhar V., Zabriskie N., Hoh J., Howes K. and Zhang K. (2006). "A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration." *Science* 314: 992-993.
- Yokoi S. and Nakayama H. (1985). "Chronic progressive leukoencephalopathy with systemic arteriosclerosis in young adults." *Clin Neuropathol* 4(4): 165-173.

## 8. Anhang



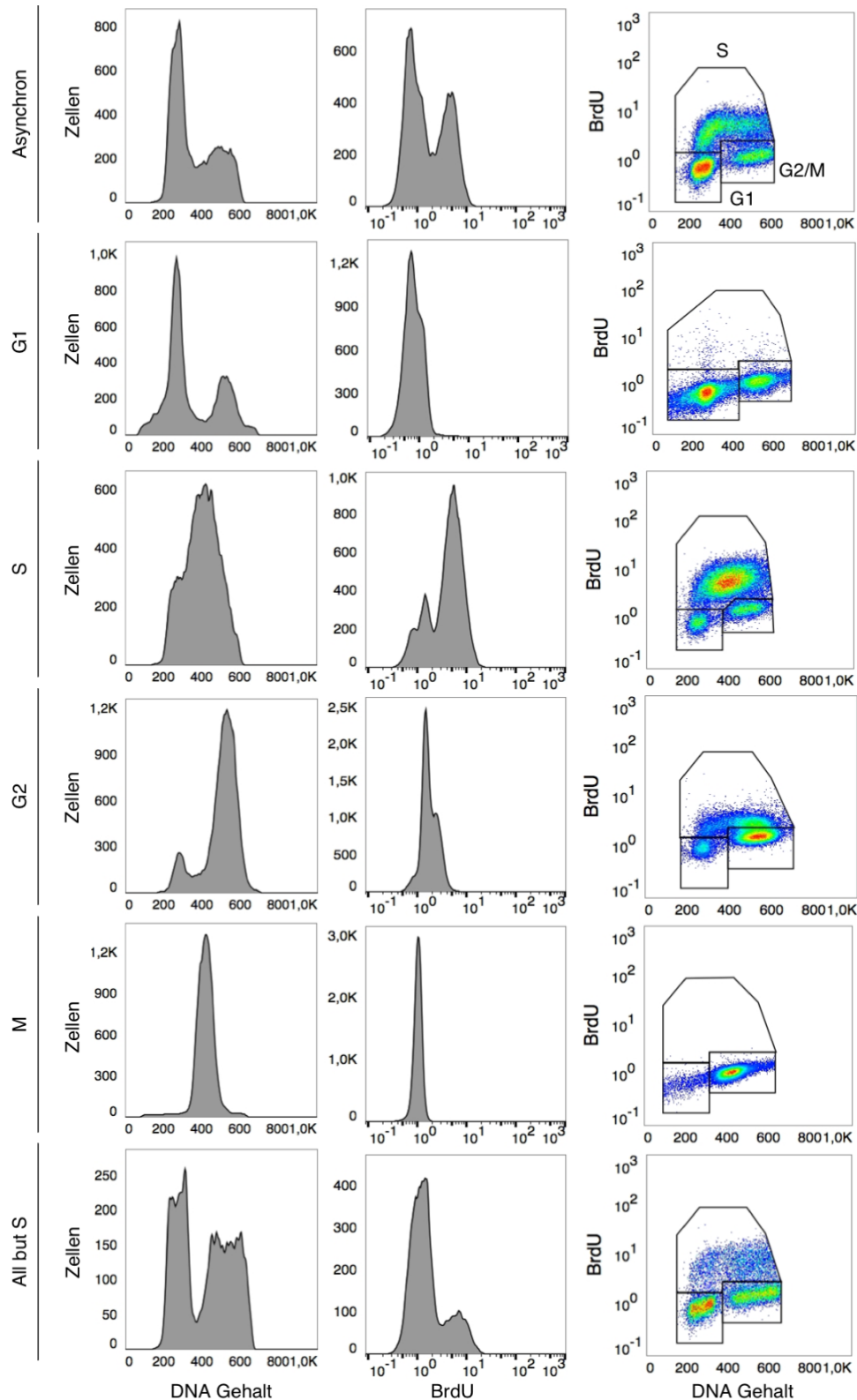
**Abb. 8.1 Synchronisation von shLV Zellen**

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von synchronisierten shLV Zellen. Der DNA Gehalt der Zellen wurde mit PI bestimmt (2.3.9). Zusätzlich wurden die Zellen mit BrdU behandelt und mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt (BrdU-FITC). S-Phase Zellen erschienen als BrdU-positiv. Dubletten und Zelltrümmer wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl gemessener Einzelzellen in G1-, S-, und G2/M-Phase wurde bestimmt. Asynchrone Zellen dienen als Kontrolle. Für eine Quantifizierung siehe Abb. 3.17.



**Abb. 8.2 Synchronisation von shHTRA1 Zellen**

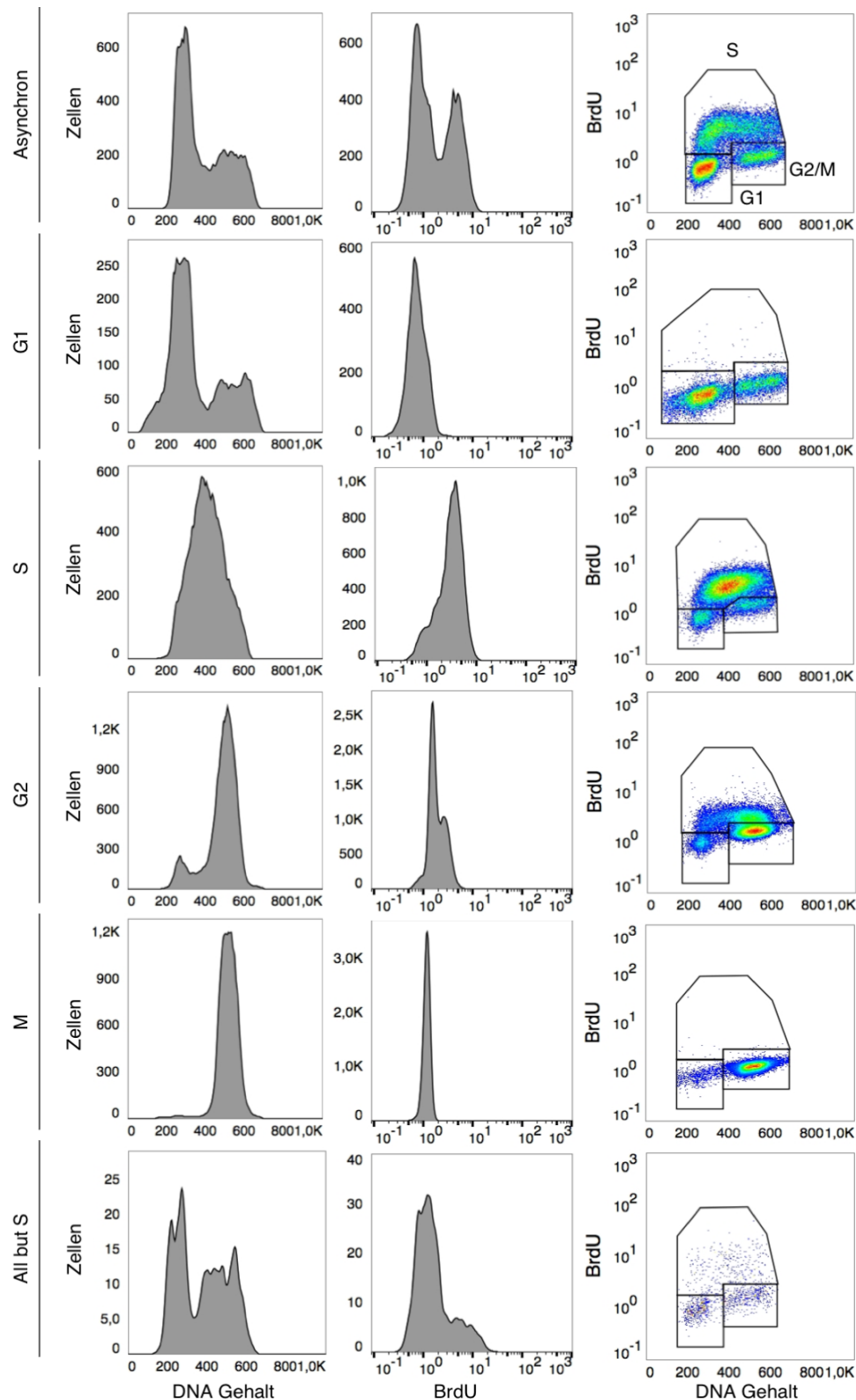
Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von synchronisierten shHTRA1 Zellen. Der DNA Gehalt der Zellen wurde mit PI bestimmt (2.3.9). Zusätzlich wurden die Zellen mit BrdU behandelt und mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt (BrdU-FITC). S-Phase Zellen erschienen als BrdU-positiv. Dubletten und Zelltrümmer wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl gemessener Einzelzellen in G1-, S-, und G2/M-Phase wurde bestimmt. Asynchrone Zellen dienen als Kontrolle. Für eine Quantifizierung siehe Abb. 3.17.



**Abb. 8.3 Synchronisation von pLV Zellen**

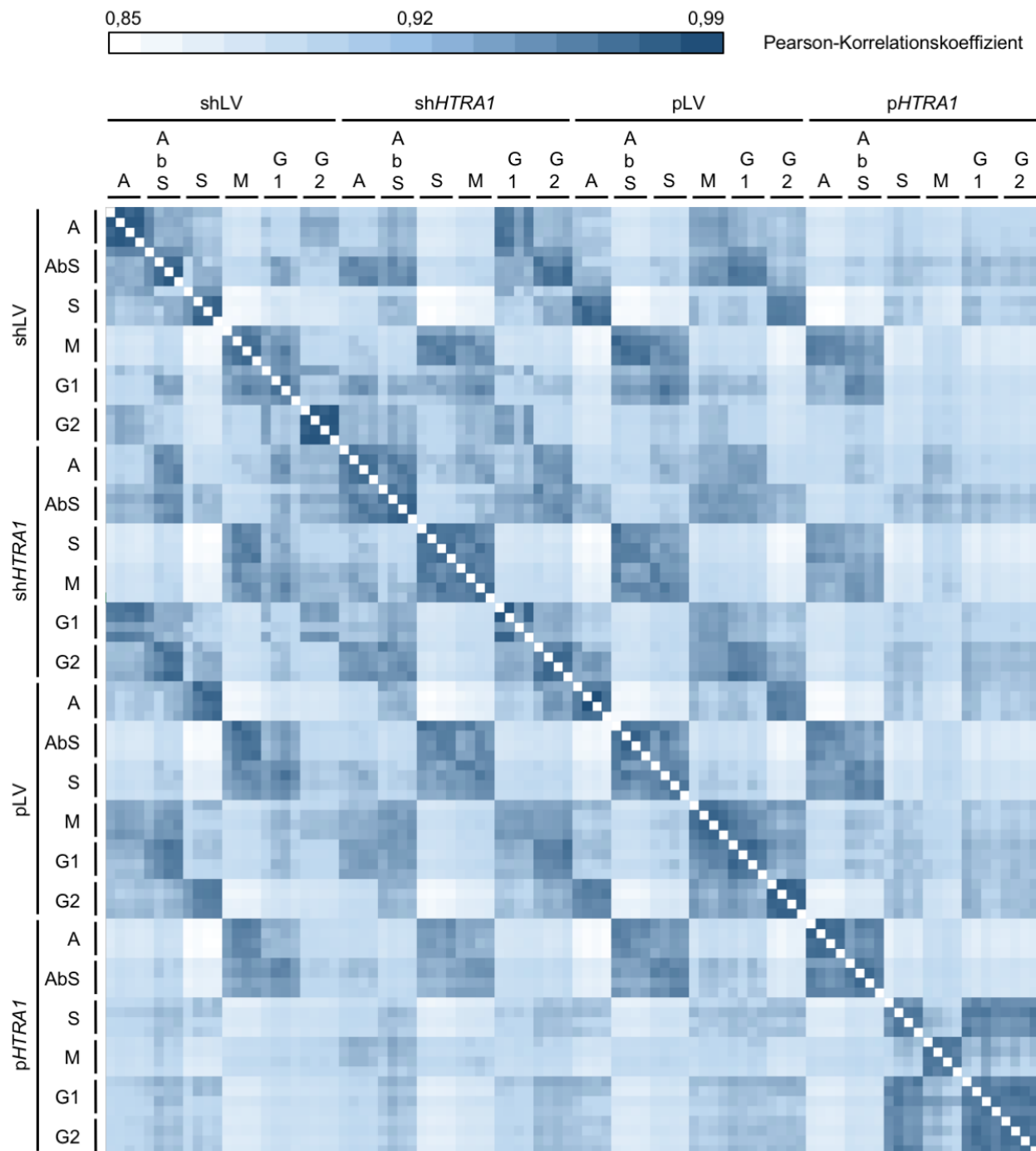
Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von synchronisierten pLV Zellen. Der DNA Gehalt der Zellen wurde mit PI bestimmt (2.3.9). Zusätzlich wurden die Zellen mit BrdU behandelt und mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt (BrdU-FITC). S-Phase Zellen erschienen als BrdU-positiv. Dubletten und Zelltrümmer wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl gemessener Einzelzellen in G1-, S-, und G2/M-Phase wurde bestimmt. Asynchrone Zellen dienen als Kontrolle. Für eine Quantifizierung siehe Abb. 3.17.





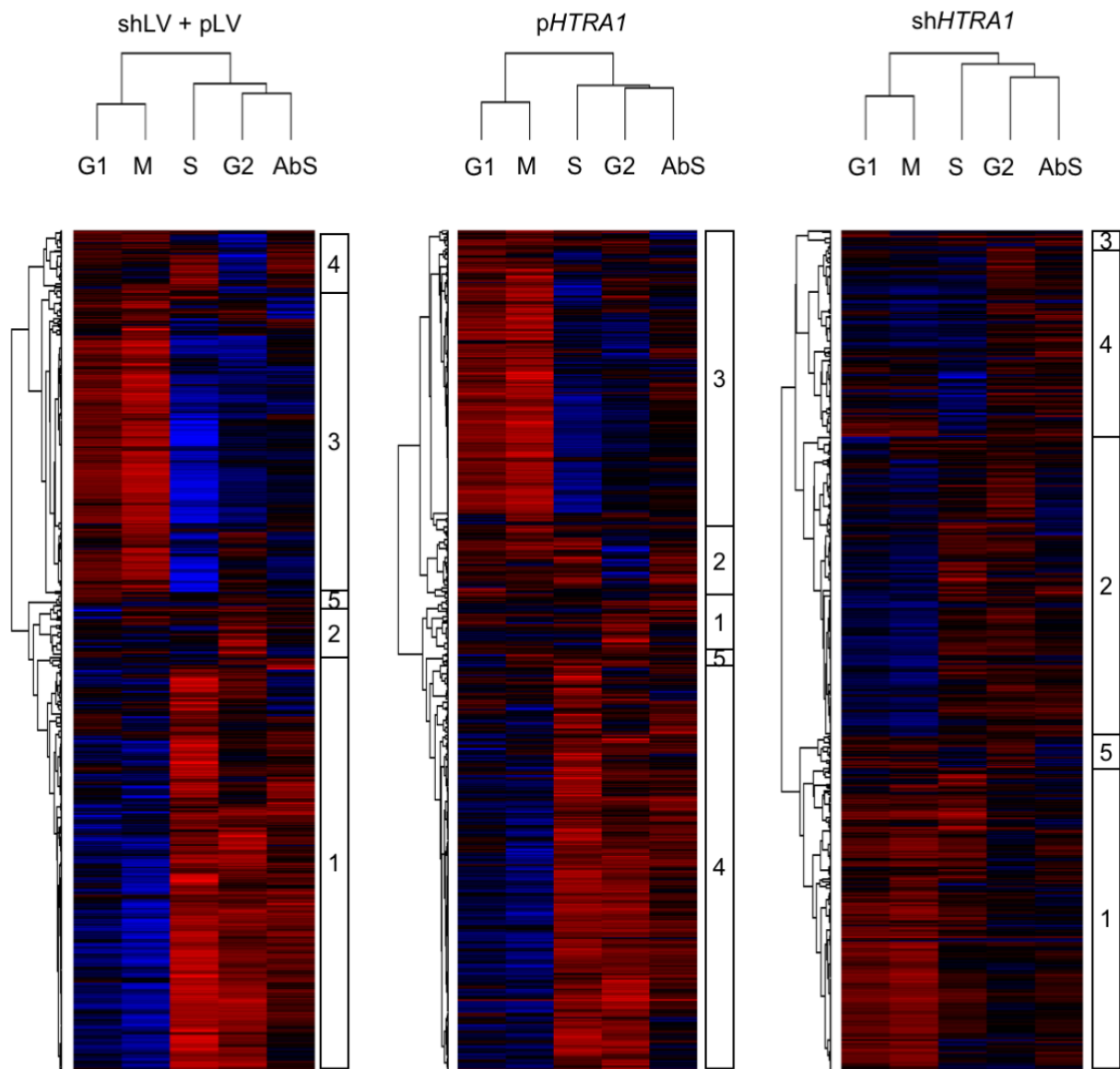
**Abb. 8.4 Synchronisation von pHTR1 Zellen**

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von synchronisierten pHTR1 Zellen. Der DNA Gehalt der Zellen wurde mit PI bestimmt (2.3.9). Zusätzlich wurden die Zellen mit BrdU behandelt und mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt (BrdU-FITC). S-Phase Zellen erschienen als BrdU-positiv. Dubletten und Zelltrümmer wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl gemessener Einzelzellen in G1-, S-, und G2/M-Phase wurde bestimmt. Asynchrone Zellen dienen als Kontrolle. Für eine Quantifizierung siehe Abb. 3.17.



**Abb. 8.5 Pearson-Korrelationskoeffizienten der 96 analysierten Proteom-Datensätze**

Die Pearson-Korrelationskoeffizienten wurden mit der Perseus Software für alle 96 x 96 Datensätze berechnet (2.1.11). Ein Koeffizient = 1 entspricht dabei einer Übereinstimmung der Datensätze von 100 %. Der Koeffizient innerhalb eines Sets biologischer Replikate war immer > 0,983, zwischen Datensätzen unterschiedlicher Bedingungen > 0,850. A = Asynchron; AbS = „All but S“.



**Abb. 8.6 Variabilität der Protein-Abundanz in Abhängigkeit der Zellzyklusphase**

*Heatmaps* der hierarchischen Clusteranalyse aller identifizierten Proteine gegen die fünf Zellzyklusphasen nach Z-Transformation für einzelne Zelllinien. Die mittlere normalisierte Abundanz der Proteine über alle Proben ist farbig kodiert (rot stärker abundant, blau weniger abundant). Die Proteine wurden nach ihrem Abundanzprofil in fünf Cluster eingeteilt (markiert durch die Balken rechts der *Heatmap*). Die ersten vier Cluster zeigten in allen Zelllinien ähnliche angereicherte *GOBP-terms* (Daten nicht gezeigt). Die Abundanz von Proteinen innerhalb dieser Cluster zeigte jedoch große Unterschiede.

**Tab. 8.1 Top 20 Proteine, deren Abundanz sich signifikant Zellzyklus abhängig änderte**

Ergebnisse des Zwei-Wege-ANOVA aller synchronisierten Proben (asynchrone Proben wurden nicht eingeschlossen). Die Proteine sind nach ihrer Signifikanz absteigend sortiert (*p-value*).

<b>Protein</b>	<b>Gen</b>	<b><i>p-value</i></b>
Periplakin	PPL	1e-65
Targeting protein for Xklp2	TPX2	2e-65
Protein RRP5 homolog	PDCD11	1e-61
CCAAT/enhancer-binding protein zeta	CEBPZ	2e-59
Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	8e-59
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	DDX27	8e-58
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	1e-57
Protein SON	SON	2e-57
Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1	3e-57
Annexin A3	ANXA3	4e-56
Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	7e-56
Ribosome-binding protein 1	RRBP1	8e-56
Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	2e-55
Puromycin-sensitive aminopeptidase	NPEPPS	5e-55
Fatty acid synthase	FASN	5e-55
Transgelin-2	TAGLN2	7e-55
Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	BMS1	2e-53
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	6e-53
ATP-dependent RNA helicase DDX24	DDX24	8e-53
Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1	8e-53

**Tab. 8.2 Top 20 Proteine, deren Abundanz sich signifikant in Abhängigkeit des HTRA1 Levels änderte**

Ergebnisse des Zwei-Wege-ANOVA aller synchronisierten Proben (asynchrone Proben wurden nicht eingeschlossen). Die Proteine sind nach ihrer Signifikanz absteigend sortiert (*p-value*).

<b>Protein</b>	<b>Gen</b>	<b><i>p-value</i></b>
Annexin A1	ANXA1	4e-55
Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase	CPOX	2e-48
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	DHX30	2e-45
Fascin	FSCN1	3e-44
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	7e-44
Epiplakin	EPPK1	8e-44
4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	ALDH9A1	3e-43
Integrin alpha-6	ITGA6	4e-43
Discoidin	DCBLD2	1e-42
Ras-related protein Rab-3B	RAB3B	2e-41
Cadherin-1	CDH1	2e-40
Cathepsin B	CTSB	5e-40
Cell surface glycoprotein MUC18	MCAM	1e-39
Melanotransferrin	MF12	6e-39
Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYSL3	7e-39
Elongation factor G	GFM1	7e-39
Filamin-B	FLNB	8e-39
Dynamin-like 120 kDa protein	OPA1	1e-38
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	NGFR	4e-38
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	BDH1	6e-38

**Tab. 8.3 Top 20 Proteine, deren Abundanz sich signifikant in Abhängigkeit einer Interaktion von Zellzyklusphase und HTRA1 Level änderte**

Ergebnisse des Zwei-Wege-ANOVA aller synchronisierten Proben (asynchrone Proben wurden nicht eingeschlossen). Die Proteine sind nach ihrer Signifikanz absteigend sortiert (*p-value*).

<b>Protein</b>	<b>Gen</b>	<b><i>p-value</i></b>
Asparagine synthetase	ASNS	3e-25
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	1e-24
Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	8e-24
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	8e-23
Purine nucleoside phosphorylase	PNP	9e-23
Alpha-enolase	ENO1	1e-20
Tyrosine-protein kinase SYK	SYK	2e-20
Leukotriene A-4 hydrolase	LTA4H	2e-19
Aspartate aminotransferase	GOT1	3e-19
Zinc finger protein 185	ZNF185	4e-19
Fatty acid-binding protein.epidermal	FABP5	4e-19
Programmed cell death 6-interacting protein	PDCD6IP	4e-19
Transgelin-2	TAGLN2	8e-19
Phosphoserine aminotransferase	PSAT1	9e-19
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	1e-18
Actin filament-associated protein 1-like 2	AFAP1L2	1e-18
Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	2e-18
Calpain-2 catalytic subunit	CAPN2	7e-18
Dynamin-1-like protein	DNM1L	8e-18
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	NGFR	1e-17

**Tab. 8.4 Liste von Zellzyklus assoziierten GOBP-terms**

Innerhalb des Proteom Datensatzes wurden 46 GO-terms identifiziert, die der Regulation des Zellzyklus oder einzelnen Zellzyklusphasen assoziiert waren. Die Art des GO-terms und die Anzahl der Proteine, die in diesem Datensatz jedem GO-term zugeordnet waren ist angegeben (Größe).

Typ	Name	Größe
GOBP name	<i>cell cycle</i>	405
GOBP name	<i>cell cycle arrest</i>	62
GOBP name	<i>cell cycle checkpoint</i>	86
GOBP name	<i>cell cycle cytokinesis</i>	21
GOBP name	<i>cell cycle phase</i>	178
GOBP name	<i>cell cycle process</i>	508
GOBP name	<i>cell division</i>	223
GOBP name	<i>cytokinesis</i>	49
GOBP name	<i>cytokinesis after mitosis</i>	19
GOBP name	<i>cytokinetic cell separation</i>	14
GOBP name	<i>cytokinetic process</i>	18
GOBP name	<i>G1 to G0 transition</i>	2
GOBP name	<i>G1/S transition checkpoint</i>	6
GOBP name	<i>G1/S transition of mitotic cell cycle</i>	106
GOBP name	<i>G2/M transition checkpoint</i>	15
GOBP name	<i>G2/M transition DNA damage checkpoint</i>	15
GOBP name	<i>G2/M transition of mitotic cell cycle</i>	87
GOBP name	<i>mitosis</i>	159
GOBP name	<i>mitotic cell cycle</i>	297
GOBP name	<i>mitotic cell cycle arrest</i>	3
GOBP name	<i>mitotic cell cycle checkpoint</i>	59
GOBP name	<i>mitotic cell cycle DNA replication checkpoint</i>	2
GOBP name	<i>mitotic cell cycle G1/S transition checkpoint</i>	6
GOBP name	<i>mitotic cell cycle G1/S transition DNA damage checkpoint</i>	6
GOBP name	<i>mitotic cell cycle G2/M transition checkpoint</i>	8
GOBP name	<i>mitotic cell cycle G2/M transition DNA damage checkpoint</i>	8
GOBP name	<i>mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint</i>	25
GOBP name	<i>mitotic cell cycle spindle checkpoint</i>	27
GOBP name	<i>mitotic centrosome separation</i>	4
GOBP name	<i>mitotic chromosome condensation</i>	10
GOBP name	<i>mitotic chromosome movement towards spindle pole</i>	3
GOBP name	<i>mitotic metaphase plate congression</i>	25
GOBP name	<i>mitotic metaphase/anaphase transition</i>	5
GOBP name	<i>mitotic nuclear envelope disassembly</i>	37
GOBP name	<i>mitotic nuclear envelope reassembly</i>	10
GOBP name	<i>mitotic recombination</i>	29
GOBP name	<i>mitotic sister chromatid cohesion</i>	8
GOBP name	<i>mitotic sister chromatid segregation</i>	16
GOBP name	<i>mitotic sister chromatid separation</i>	1
GOBP name	<i>mitotic spindle elongation</i>	2
GOBP name	<i>mitotic spindle organization</i>	24
GOBP name	<i>mitotic spindle organization in nucleus</i>	1
GOBP name	<i>mitotic spindle stabilization</i>	2
GOBP name	<i>regulation of cell cycle</i>	418
GOBP name	<i>regulation of cell cycle arrest</i>	151
GOBP name	<i>regulation of cell cycle process</i>	245

**Tab. 8.5 Angereicherte GOBP-terms unter Proteinen, deren Abundanz invers mit dem HTRA1 Level korrelierte**

Gezeigt sind die 14 signifikant angereicherten *GOBP-terms* der HTRA1 invers-korrelierenden Proteine des Proteom-Datensatzes (3.5.3) mit p-value und Anreicherung (*GOrilla online tool*, p-value 0,001). Angegeben sind außerdem die Anzahl der Proteine, die allgemein mit dem *GOBP-term* assoziiert sind (Proteine) und die übereinstimmende Anzahl der Proteine aus dem untersuchten Datensatz (Hits).

<b>GOBP-term</b>	<b>p-value</b>	<b>Anreicherung</b>	<b>Proteine</b>	<b>Hits</b>
gliogenesis	1,10E-04	94	2	2
pyrimidine-containing compound metabolic process	6,40E-04	34578	38	4
UTP biosynthetic process	6,50E-04	47	4	2
positive regulation of fatty acid metabolic process	6,50E-04	47	4	2
cerebellar cortex formation	3,30E-04	63	3	2
post-chaperonin tubulin folding pathway	6,50E-04	47	4	2
regulation of apoptotic process	8,00E-04	20121	519	14
microtubule cytoskeleton organization	7,10E-04	22737	143	7
pyrimidine nucleoside biosynthetic process	8,20E-04	16	18	3
cellular developmental process	8,60E-04	45323	716	17
nucleoside metabolic process	9,10E-04	20607	72	5
regulation of programmed cell death	9,20E-04	18660	526	14
pyrimidine nucleotide metabolic process	1,20E-04	43054	25	4
pyrimidine nucleoside metabolic process	1,40E-04	15	26	4



**Tab. 8.6 Funktionelle Klassifikation der Arten von reguliertem Zelltod durch das NCCD**

Diese Klassifikation wurde übernommen aus (Galluzzi *et al.*, 2012).<sup>a</sup> Pharmakologische und genetische Interventionen sollten nur dann als inhibitorisch akzeptiert werden, wenn das Vorkommen von zelltod tatsächlich reduziert, nicht aber, wenn nur ein Wechsel zwischen verschiedenen Arten von Zelltod oder die Morphologie des Zelltodes verändert wird. Abkürzungen: ATG, *autophagy*; BCN1, *beclin 1*; Dcm, *mitochondrial transmembrane potential*; CrmA, *cytokine response modifier A*; DAPK1, *death-associated protein kinase 1*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; ERK1, *extracellular-regulated kinase 1*; IL, *interleukin*; MAP1LC3, *microtubule-associated protein 1 light chain 3*; MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*; NET, *neutrophil extracellular trap*; PAD4, *peptidylarginine deiminase 4*; PAR, *poly(ADP-ribose)*; PARP1, *poly(ADP-ribose) polymerase 1*; PP2A, *protein phosphatase 2A*; ROCK1, *RHO-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*; SQSTM1, *sequestosome 1*; TG, *transglutaminase*; Z-VAD-fmk, *N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone*; Z-YVAD-fmk, *N-benzyloxycarbonyl-Tyr-Val-Ala-DLAsp-fluoromethylketone*.

	Main biochemical features	Caspase dependence	Examples of inhibitory interventions <sup>a</sup>
Anoikis	Downregulation of EGFR Inhibition of ERK1 signaling Lack of $\beta$ 1-integrin engagement Overexpression of BIM Caspase-3 (-6,-7) activation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Autophagic cell death	MAP1LC3 lipidation SQSTM1 degradation	--	VPS34 inhibitors AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 or BCN1 genetic inhibition
Caspase-dependent intrinsic apoptosis	MOMP Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation	++	BCL-2 overexpression Z-VAD-fmk administration
Caspase-independent intrinsic apoptosis	Release of IMS proteins Respiratory chain inhibition	--	BCL-2 overexpression
Cornification	Activation of transglutaminases Caspase-14 activation	+	Genetic inhibition of TG1, TG3 or TG5 Genetic inhibition of caspase-14
Entosis	RHO activation ROCK1 activation	--	Genetic inhibition of metallothionein 2A Lysosomal inhibitors
Extrinsic apoptosis by death receptors	Death receptor signaling Caspase-8 (-10) activation BID cleavage and MOMP (in type II cells) Caspase-3 (-6,-7) activation	++	CrmA expression Genetic inhibition of caspases (8 and 3) Z-VAD-fmk administration
Extrinsic apoptosis by dependence receptors	Dependence receptor signaling PP2A activation DAPK1 activation Caspase-9 activation Caspase-3 (-6,-7) activation	++	Genetic inhibition of caspases (9 and 3) Genetic inhibition of PP2A Z-VAD-fmk administration
Mitotic catastrophe	Caspase-2 activation (in some instances) TP53 or TP73 activation (in some instances) Mitotic arrest	--	Genetic inhibition of TP53 (in some instances) Pharmacological or genetic inhibition of caspase-2 (in some instances)
Necroptosis	Death receptor signaling Caspase inhibition RIP1 and/or RIP3 activation	--	Administration of necrostatin(s) Genetic inhibition of RIP1/RIP3
Netosis	Caspase inhibition NADPH oxidase activation NET release (in some instances)	--	Autophagy inhibition NADPH oxidase inhibition Genetic inhibition of PAD4
Parthanatos	PARP1-mediated PAR accumulation Irreversible $\Delta\psi_m$ dissipation ATP and NADH depletion PAR binding to AIF and AIF nuclear translocation	--	Genetic inhibition of AIF Pharmacological or genetic inhibition of PARP1
Pyroptosis	Caspase-1 activation Caspase-7 activation Secretion of IL-1 $\beta$ and IL-18	++	Administration of Z-YVAD-fmk Genetic inhibition of caspase-1

## 9. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Professor Michael Ehrmann bedanken. Danke, dass ich in deiner Arbeitsgruppe an diesem spannenden aber auch herausfordernden Thema arbeiten durfte, dass du mich unterstützt und dir wirklich immer Zeit für gute Gespräche genommen hast. Ich möchte dir auch dafür danken, dass du mir die richtige Anleitung und gleichzeitig die nötige Freiheit gegeben hast, um eine selbstständige und kritisch denkende Wissenschaftlerin zu werden.

Vielen Dank auch an Professor Markus Kaiser und Dr. Farnusch Kaschani für ihre Hilfe mit den massenspektrometrischen Analysen. Es war wirklich toll, dass ihr euch die Zeit genommen habt alle meine Fragen zu beantworten und Ideen zu diskutieren. Danke Svenja, für die Hilfe beim Aufbereiten der Peptide und Messen der Samples – Schätzelein, es hat trotz der Masse an Proben richtig viel Spaß gemacht. Danken möchte ich auch Dr. Frank Breitenbücher für seine Hilfe mit den SubG1-Messungen und der AG Gunzer, insbesondere Linda und Marc, für ihre unermüdliche Hilfe bei allen Fragen und Problemen rund um die FACS-Analysen.

Liebe Ehrmänner, es war wirklich schön. Danke an alle Mitglieder der besten Arbeitsgruppe der Welt. Die Atmosphäre im Labor hat dafür gesorgt, dass ich jeden Morgen gern zur Arbeit gekommen bin – auch wenn es im Labor mal nicht so gut lief. Ihr alle seid schon lange keine Arbeitskollegen, sondern Freunde für mich geworden. Vielen Dank Vanda! Du bist die ganzen Jahre nicht nur die beste Schreibtisch- und Bench-Nachbarin der Welt, sondern auch eine großartige Mentorin gewesen. Ohne deine guten Ideen, aufmunternden Worte und dein offenes Ohr hätte ich diese vier Jahre bestimmt nicht so gut überstanden! Danke Melisa, für deine ruhige Ausstrahlung, Unterstützung und dein riesiges Wissen zur Lösung wissenschaftlicher Probleme. Es war unschätzbar viel wert, dass ich mit all' meinen Problemen zu dir kommen durfte! Mein Dank gilt außerdem unserem Dienstältesten, dem „kleinen Michael“. Danke, dass du immer für uns Doktoranden da bist. Von dir habe ich außerdem gelernt, wie man gute Lehre macht und Spaß daran hat! Weiterhin möchte ich Kenny danken. Du hast mir mit deinem Informatikwissen das Leben gerettet! Ohne dich würde ich wohl noch in 100 Jahren die Proteom-Daten auswerten. Helmut! Kär wat ham wir malocht! Und das zu den unmöglichsten Zeiten. Vielen Dank für deine

unerschöpfliche Unterstützung (sowohl experimenteller als auch organisatorischer Natur). Danke auch für die vielen schönen außerdienstlichen Unternehmungen. Danke auch an Adam, für die vielen spannenden Unterhaltungen jeglicher Art, die lustige Atmosphäre im Büro und deine Hilfe mit allem was ein Kabel hat (und die Trillionen von Gelen nicht zu vergessen!). Danke an Juliane, für die gemütlichen Chai-Latte-Pausen und vielen guten Tipps! Du hast es geschafft mich ein ums andere Mal wieder zu motivieren, wenn ich im Laborchaos versunken bin. Danke Maike, dass du mich nicht nur im Ehrmann Labor eingearbeitet hast (die Zeit ist wirklich verflogen), sondern auch immer ermutigt hast „Nein“ zu sagen und auch nach deinem Überlaufen nach Düsseldorf eine gute Freundin geblieben bist! Ohne dich und Svenja könnte ich die Herren beim Doppelkopf wohl nur schwerlich ertragen ☺. Juliana, es war wirklich schön mit dir zu arbeiten. Danke, dass du eine so motivierte und unkomplizierte „Kooperationspartnerin“ warst! Danke Yvonne, Kathi, Anika, Linda, Kamilla, Svenja, Jens und Pablo für die netten Mittags- und Kaffeepausen mit vielen schönen Gesprächen – es gab immer etwas zu lachen und auch mal das ein oder andere Leid zu klagen. Vielen Dank Helmut, Adam, Svenja und Mina, dass ihr unser Labor vor dem Chaos bewahrt – ohne euch läuft nichts. Vielen Dank Michael, Melisa, Maike und Anika für's Korrekturlesen dieses langen Schriftstücks. Ich werde versuchen, euch mit viiiiiieeeeeel Kuchen zu entschädigen ☺

Ohne die Unterstützung meiner Freunde und Familie, vor allem auch meiner Eltern, hätte ich diese Arbeit wohl niemals geschrieben. Danke, dass ihr alle immer an mich geglaubt habt! Eure Liebe und Unterstützung bedeutet mir mehr als ich sagen kann. Ihr habt mir so viel Kraft gegeben. Ich bin froh, dass ihr diese, manchmal anstrengenden, vier Jahre mit mir durchgehalten habt. Und es ist schön, dass ihr euch für meine Arbeit begeistert auch wenn ihr nicht immer versteht was ich im Labor Komisches treibe. Ich bin sehr froh, dass ich euch habe!

Und der größte Dank gilt natürlich Tim. Du bist seit so vielen Jahren nicht nur mein Partner (jetzt Ehemann... das hört sich immer noch komisch an ☺), sondern auch mein bester Freund. Und du bist derjenige, der alle Hochs und Tiefs dieser Doktor-Zeit hautnah miterlebt hat. Danke für einfach alles. Danke, dass du der verständnis- und liebevollste Mensch dieser Welt bist.

## 10. Eidesstattliche Erklärung

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift der Doktorandin

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift der Doktorandin

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die Rolle der humanen Serinprotease HTRA1 in Zellzyklus und Apoptose“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Jasmin Schillinger befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

---

## **11. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.